

64



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Identificación y Distribución de Células MHC
C-II⁺ Dendríticas en el Intestino de Ratones
Balb/c, C57BL/6 y CD40L^{-/-}

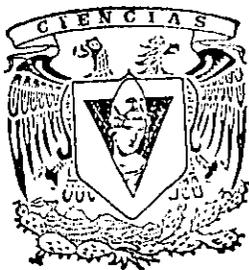
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :

Adriana Flores Langarica

294311

Dr. Leopoldo Flores Romo

DIRECTOR DE TESIS



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

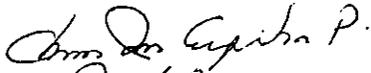
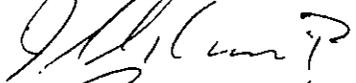
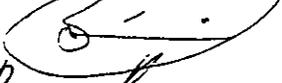
Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Identificación y Distribución de Células MHC C-II⁺ Dendríticas en el Intestino
de Ratones Balb/c, C57BL/6 y CD40L-/-

realizado por Adriana Flores Langarica

con número de cuenta 09650388-7, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de Tesis Propietario Dr. Leopoldo Flores Romo 
- Propietario Dra. Clara Ines Espitia Pinzón 
- Propietario QFB Jose Luis Silencio Barrita 
- Suplente QFB Mónica Berenice Heras Chavarria 
- Suplente M en C Fernando Ramos Reyes 

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS U.N.A.M.


P.A.
Dra. Luisa A. Alba Lois



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

Agradecimientos

Quiero agradecer, todo el apoyo y atención que el Dr. Leopoldo Flores Romo me brindó para la realización de este trabajo, a todo el grupo del Laboratorio de Inmunología Celular del Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV, muy en especial a la QBP Juana Calderón Amador.

Las recomendaciones de Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, del QFB José Luis Silencio Barrita y el M. en C. Fernando Ramos Reyes, las cuales ayudaron a mejorar el presente escrito.

A mi familia, que me apoyó y creyó en mí siempre, a Francisco por caminar a mi lado en la realización de muchos sueños y a todos mis amigos y profesores de la facultad con quienes compartí muchos momentos.

Dedicatoria

El presente trabajo esta dedicado a toda la gente que a lo largo de mi vida me ha hecho ser un mejor ser humano y profesionista, y muy especialmente a Leoncio Langarica, cuyo cariño y confianza no solo me han fortalecido a mi.

Índice

Lista de figuras, gráficas y tablas	3
Lista de Abreviaturas.....	4
Resumen.....	6
Introducción.....	7
Anatomía Intestinal	7
Estructura Histológica General.....	7
Mucosa.....	7
Submucosa	10
Muscular Externa.....	11
Serosa.....	11
Intestino Delgado.....	11
Duodeno.....	11
Yeyuno.....	12
Ileon.....	12
Intestino Grueso	12
Ciego.....	13
Colon.....	13
Recto.....	14
Ecología Intestinal.....	14
Inmunología Intestinal	15
Células Dendríticas.....	20
Células Dendríticas en Órganos no Linfoides	22
Células Dendríticas en Circulación.....	24
Células Dendríticas en Órganos Linfoides	24
Linajes de Células Dendríticas	24
Estimulación de Linfocitos T	28
Caracterización en Intestino.....	29
Justificación.....	32
Objetivo General.....	33
Objetivos Particulares.....	33
Material y Métodos.....	34
Animales	34
Obtención de Láminas Intestinales.....	34
Inmunohistoquímica.....	35
Cinética.....	37
Montaje.....	38
Conteo.....	38
Cortes Semifinos de las Láminas Obtenidas	39
Análisis Estadístico.....	39
Resultados.....	40
Caracterización Inmunohistoquímica de Láminas Intestinales de ratones Balb/c, C57BL/6 y CD40L^{-/-} 40	

Cinética de Expresión de MHC CII en ratones Balb/c	45
Localización Histológica de las poblaciones celulares descritas por Inmunohistoquímica	47
<i>Discusión.....</i>	<i>51</i>
<i>Conclusiones.....</i>	<i>54</i>
<i>Perspectivas.....</i>	<i>54</i>
<i>Referencias.....</i>	<i>55</i>
<i>Apéndice 1.....</i>	<i>61</i>
<i>Apéndice 2.....</i>	<i>64</i>

Lista de figuras, gráficas y tablas

Figura 1	Estructura histológica del intestino
Figura 2	Tracto digestivo de ratón
Figura 3	Estructura general de las Placas de Peyer
Figura 4	Desarrollo y funcionalidad de las células dendríticas
Figura 5	Linajes de las células dendríticas
Figura 6	Diagrama de flujo que ilustra la metodología que se usó para la obtención de las láminas intestinales.
Figura 7	Diagrama de flujo que ilustra la inmunohistoquímica que se realizó usando los anticuerpos primarios anti- MHC CII, anti-Thy-1 y anti-CD11b(Mac-1).
Figura 8	Diagrama que ilustra las interacciones entre los componentes del sistema usados en la inmunohistoquímica. La interacción entre la peroxidasa y la DAB produce precipitados de color marrón, lo cual evidencia la reacción.
Figura 9	Inmunohistoquímica con MHC CII en la lámina intestinal interna y externa, obtenidas después de tratamiento con EDTA.
Figura 10	Inmunohistoquímica con MHC CII en intestino de 3 cepas de ratones.
Figura 11	Inmunohistoquímica con Thy-1 en intestino de 3 cepas de ratones.
Figura 12	Inmunohistoquímica con CD11b (Mac-1) en intestino de 3 cepas de ratones.
Figura 13	Cortes transversales de intestino normal de ratón Balb/c, HE.
Figura 14	Cortes transversales de intestino normal de ratón Balb/c, sección interna y externa después de EDTA.
Tabla 1	Características generales de las células dendríticas maduras e inmaduras
Gráfica 1	Densidad de células MHC CII ⁺ en intestino de 3 cepas de ratón.
Gráfica 2	Densidad de células Thy ⁺ con morfología dendrítica en intestino de 3 cepas de ratón.
Gráfica 3	Densidad de células Thy ⁺ con morfología no dendrítica en intestino de 3 cepas de ratón.
Gráfica 4	Densidad de células CD11b (Mac-1) ⁺ en intestino de 3 cepas de ratón.
Gráfica 5	Densidad de células dendríticas MHC CII ⁺ por área, en intestino de ratones Balb/c de diferentes edades en cuatro regiones anatómicas.

Lista de Abreviaturas

APC	Célula presentadora de antígeno
BSA	Albúmina serica bovina
DC	Célula dendrítica
DAB	Diaminobenzidina
DDSA	Dodecenil anhídrido succínico
DETC	Células T dendríticas epidérmicas
DMP-30	Tri-dimetilaminometil-fenol
CLA	Antígeno linfocítico cutáneo
CP	Célula plasmática
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
FAE	Epitelio asociado al folículo
Fc	Fracción cristalizable de un anticuerpo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
GM-CSF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos
HPV	Virus del papiloma humano
ID	Intestino delgado
IG	Intestino grueso
IFN γ	Interferon γ
IFR	Región interfolicular
LC	Célula de Langerhans
LIE	Linfocitos intraepiteliales
LP	Lamina propia
LPS	Lipopolisacárido
M-CSF	Factor de estimulación de colonias de monocitos
M-CSFr	Receptor del factor de estimulación de colonias de monocitos
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MHC CI	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
MHC CII	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
MICA	Molécula tipo MHC CI A
MICB	Molécula tipo MHC CI B
MLN	Ganglios linfáticos mesentéricos

MLR	Reacción mixta de leucocitos
NMA	Anhidrido metil nádic
PBS	Amortiguador de fosfatos
PP	Placa de Peyer
PTC	Célula T plasmacitoide
TCR	Recepto de linfocito T
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
SAVPOX	Estreptavidina peroxidada
SED	Domo subepitelial
SCF	Factor de células progenitoras
SS	Solución salina

Resumen

La activación de linfocitos T requiere que el antígeno sea capturado, procesado y presentado por una célula profesional presentadora de antígeno (APC, del inglés Antigen Presenting Cells). Un número importante de trabajos recientes han demostrado que las células dendríticas (DC, del inglés Dendritic Cells) son las APC más importantes en la activación de los linfocitos T vírgenes. Estas células están ampliamente distribuidas en tejidos periféricos no linfoides (piel, tráquea, epitelio vaginal e intestino), sitios donde la estimulación antigénica es muy importante. En estas áreas, la principal función de las DC es captar antígenos, posteriormente migran transportando y procesando dichos antígenos, para finalmente presentarlos a los linfocitos T en el tejido linfóide más próximo. La población de DC más estudiada radica en piel, donde se conocen como células de Langerhans. El intestino es un tejido de gran interés, ya que representa la superficie mucosa más amplia del organismo y es ahí donde se da una mayor estimulación antigénica de manera constante. En el presente trabajo, usando los marcadores MHC CII, CD11b (Mac-1) y Thy-1, se buscaron nuevas poblaciones con morfología dendrítica en intestino de tres diferentes cepas de ratones (Balb/c, C57BL/6 y CD40L^{-/-}). Se aplicó en este órgano la técnica de separación de láminas epidérmicas usada en piel de manera convencional.

Utilizando los marcadores arriba mencionados con técnicas inmunohistoquímicas, se encontraron poblaciones en la lámina intestinal interna con morfología claramente dendrítica en el caso de MHC CII y CD11b(Mac-1). Las densidades celulares se incrementaron a lo largo del intestino, aunque los valores no reflejan una diferencia significativa entre las cepas de ratón. Aplicando el marcaje con Thy-1 se encontraron dos poblaciones positivas, una con morfología evidentemente dendrítica y otra con morfología no dendrítica. Estas dos poblaciones se encontraron a lo largo de todo el intestino y en las tres cepas con que se trabajó. En el caso de las células con morfología dendrítica, la densidad de estas células aumentó a lo largo del intestino, mientras que para las no dendríticas se encontraron los niveles más altos en el intestino delgado y un decremento en la densidad en el intestino grueso.

Así pues en el presente trabajo se encontraron poblaciones aparentemente no descritas de células con morfología dendrítica, positivas para los marcadores MHC CII⁺, CD11b (Mac-1)⁺ y Thy-1⁺, en la lámina intestinal interna obtenida por tratamiento con EDTA.

Introducción

Anatomía Intestinal

La gran mayoría de los antígenos que estimulan al sistema inmune penetran vía mucosas, como el tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio. Como resultado, se ha desarrollado en las mucosas un amplio y complejo sistema de órganos y elementos linfoides asociados (Mowat and Viney 1997). Pese a ello actualmente se considera que el campo de la inmunología de mucosas está prácticamente iniciándose, y que además cuenta con numerosas particularidades comparado con los conceptos de la inmunología clásica (Kagnoff and Kiyono 1996). Es por ello que se considera importante el estudio inmunológico en el tracto digestivo.

El intestino representa la superficie de contacto más amplia del organismo a la cual se enfrentan los antígenos; además de los elementos inmunes, se debe considerar que la misma estructura y condiciones funcionan como barrera.

Estructura Histológica General

La estructura histológica general del intestino es la siguiente:

Mucosa

Es la lámina más externa del intestino y su función es la de absorber los componentes degradados del alimento, ello se optimiza por diferentes estructuras que aumentan la superficie luminal (Geneser 1984). Los elementos histológicos que forman parte de la mucosa son el epitelio, la lámina propia (LP) y la lámina muscular de la mucosa, los cuales se describen a continuación.

- ❖ **Epitelio:** El epitelio es cilíndrico simple, compuesto por células de absorción, caliciformes, endocrinas y células de Paneth (Fig. 1). Las células de absorción son cilíndricas (aproximadamente 25μ de alto), con núcleos basales ovales. La superficie libre presenta un borde en cepillo, que al microscopio electrónico se observa formada por microvellosidades de aproximadamente 1μ de largo y 0.1μ de ancho, dispuestas paralelamente. Las microvellosidades aumentan la superficie mucosa aproximadamente 20 veces, en el centro de éstas se encuentran filamentos finos de actina y miosina, que les confiere capacidad contráctil. El citoplasma de estas células es rico en mitocondrias y presenta un retículo endoplásmico liso desarrollado. Las células son productoras de

varias enzimas, dentro de las que destacan la fosfatasa alcalina, disacaridasas y dipeptidasas. Estas células se originan en la base de las vellosidades y migran hacia la cresta mientras maduran (Geneser 1984).

Cabe recordar que una de las funciones principales de los epitelios es servir de barrera, con permeabilidad selectiva para separar fluidos de diferente composición química. Esto se logra por medio de uniones estrechas en estas células (Alberts 1991). Estas células presentan además un cinturón de adhesión alrededor de cada una de las células que forman el epitelio, localizado cerca de la parte apical de las células. Además de este tipo de unión, se presentan también desmosomas (uniones puntuales célula-célula, intracelularmente presentan unión con filamentos intermedios) y hemidesmosomas (uniones celulares que unen células de epitelios con las células de la lámina basal) (Alberts 1991).

Por encima de estas células se encuentra el glicocáliz, región que contiene enzimas (disacaridasas, peptidasas), proteínas no enzimáticas y moléculas transportadoras de proteínas, las cuales favorecen la digestión y absorción de nutrimentos (Tomohiro and Owen 1994). Además, esta región funciona también como protectora, previniendo el contacto directo con patógenos (Neutra 1998).

Las células de absorción cumplen funciones de digestión terminal, absorción de agua y nutrimentos, además de que reesterifican los ácidos grasos en triglicéridos para formar quilomicrones, y transportan la mayor parte de los nutrimentos hacia la lámina propia (LP) (Gartner and Hiatt 1997).

Las células caliciformes (Fig. 1) están dispuestas entre las células de absorción a lo largo del epitelio y se van haciendo mas abundantes hacia el íleon. Dichas células tienen una base estrecha donde se aloja el núcleo y gránulos de secreción mucosa (Leeson, Leeson et al. 1990). Además elaboran mucinógeno, cuya forma hidratada, la mucina, es un componente del moco que forma una capa protectora que reviste la luz intestinal (Gartner and Hiatt 1997). El moco esta compuesto por 1% mucina, 1% proteína libre, 1% sales dializables y 95% de H₂O. Contiene además albúmina, inmunoglobulinas (IgA), lisozima y lactoferrina (Tomohiro and Owen 1994).

Las células endocrinas que (Fig. 1) se encuentran en las criptas y en las vellosidades, se encargan de secretar péptidos que participan en la secreción gástrica y la motilidad intestinal. Son células con forma piramidal, con el núcleo orientado hacia la base de la célula (Leeson, Leeson et al. 1990).

Estas células están relacionadas con la producción y liberación de polipéptidos y proteínas con actividad hormonal, actuando como reguladoras locales. En el duodeno y el yeyuno se encuentran las células productoras de secretina (por lo que se estimula la secreción de jugo pancreático) y de colecistocinina (que estimula la secreción de enzimas pancreáticas).

Por último, las células de Paneth, (Fig. 1) localizadas solo en la base de las criptas de Lieberkühn, tienen forma piramidal con base ancha y vértice estrecho. Estas células producen lisozima, enzima capaz de digerir las paredes de algunas bacterias (Leeson, Leeson et al. 1990). Se caracterizan por la presencia de gránulos de secreción eosinófilos apicales de gran tamaño (Gartner and Hiatt 1997).

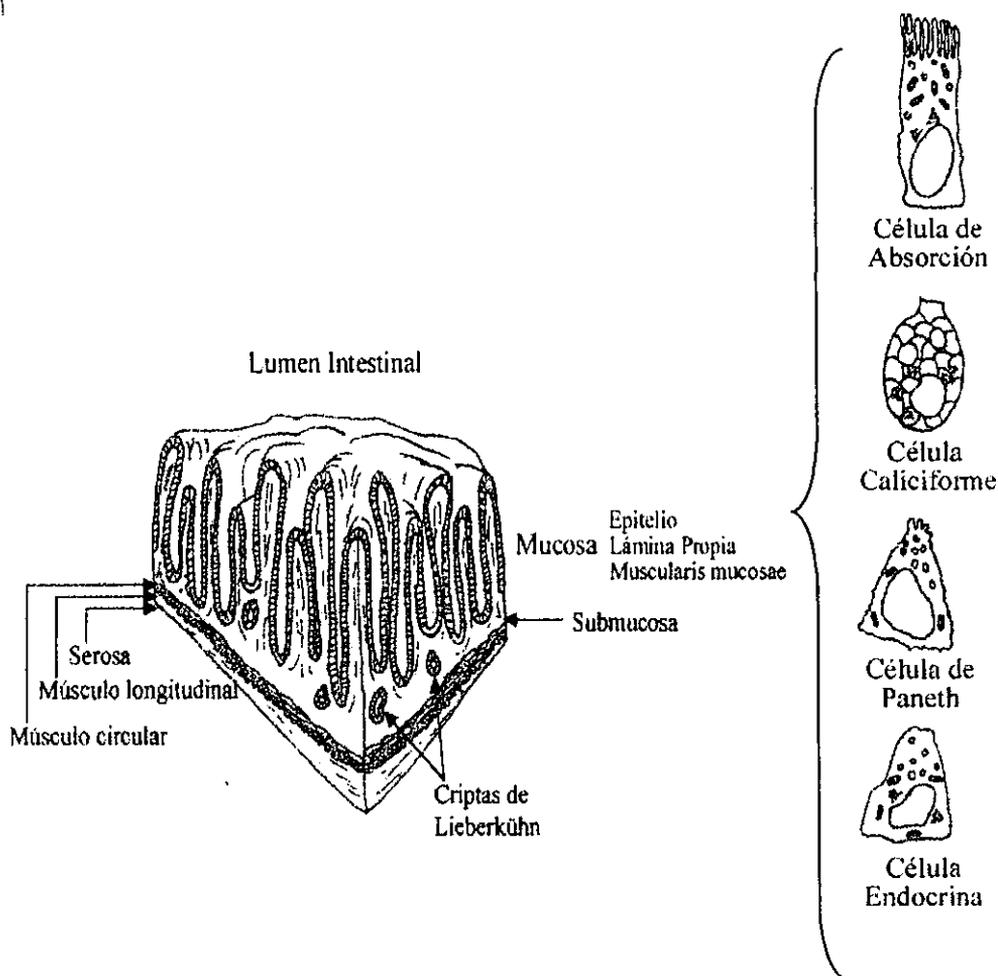


Figura 1. Estructura histológica general del intestino, se observan la mucosa, la submucosa, las láminas musculares y la serosa. Además se presentan algunas de las células típicas del epitelio intestinal.

Debajo del epitelio ya descrito se localiza la lámina basal, la cual consta de una lámina densa de entre 20 y 50 nm de grosor, cuya función es dar polaridad a las células de absorción y guiar la migración de estas (también denominadas enterocitos) desde las criptas hasta las crestas de las vellosidades, donde se desprenden después de cierto tiempo (Tomohiro and Owen 1994).

❖ Lámina Propia

La lámina propia (LP) es un tejido que sostiene estructural, metabólica y fisiológicamente al epitelio (Newby and Stokes 1984). Se extiende entre las glándulas intestinales y los núcleos de las vellosidades. Consta de fibras reticulares y células linfoides tales como; linfocitos, (Nagashima, Macda et al. 1995), células plasmáticas, (Leeson, Leeson et al. 1990), células dendríticas (Pavli, Woodhams et al. 1990) y macrófagos. Además, es en esta región donde se encuentran las Placas de Peyer (PP), que se describen como folículos solitarios, abundantes en la parte distal del intestino delgado. Además, la LP cuenta con numerosas glándulas tubulares simples llamadas criptas de Lieberkühn, las cuales se abren hacia los espacios intervallosos como perforaciones de la túnica epitelial (Gartner and Hiatt 1997).

❖ Lámina Muscular Mucosa

Está formada por una capa externa de músculo liso dispuesta en dos estratos, el primero circular y el otro longitudinal. Esta lámina le permite el plegamiento a la mucosa para promover la digestión y absorción de nutrimentos (Leeson, Leeson et al. 1990). Las fibras musculares de la capa circular interna entran en la vellosidad y se extienden a todo lo largo del centro hasta llegar a la membrana basal (Gartner and Hiatt 1997).

Submucosa

La submucosa (Fig. 1) se encuentra entre la lámina mucosa y la muscular externa y consta de tejido conectivo areolar con fibras elásticas, permite la movilidad de la mucosa y contiene plexos de vasos sanguíneos y nervios (Leeson, Leeson et al. 1990). En esta sección se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos, lo mismo que un plexo nervioso parasimpático llamado plexo submucoso de Meissner, el cual controla cierta movilidad de la mucosa (Gartner and Hiatt 1997).

Muscular Externa

Esta capa, también llamada túnica muscular (Fig. 1), consta de dos capas de fibras musculares lisas dispuestas una de forma circular interna y la otra longitudinal externa. Entre ambas existe un plexo vascular y un plexo nervioso denominado Plexo Mesentérico de Auerbach (Gartner and Hiatt 1997). Esta capa impulsa el material alimenticio por la luz intestinal, fenómeno llamado peristaltismo (Leeson, Leeson et al. 1990).

Serosa

Es la túnica mas externa y está formada por tejido conectivo areolar elástico. A veces se mezcla con el tejido conectivo de las estructuras vecinas y recibe el nombre de adventicia, pero hay otras regiones donde está cubierta por el peritoneo y entonces se le llama serosa (Leeson, Leeson et al. 1990).

Intestino Delgado

El intestino delgado (ID) es un órgano tubular que va desde el píloro del estómago hasta la válvula ileocecal, se divide en 3 porciones duodeno, yeyuno e íleon. Su principal función es la absorción, la cual comprende el transporte de agua, iones inorgánicos y sustancias alimenticias degradadas. El agua se absorbe exclusivamente por difusión osmótica simple, mientras que los iones se absorben por un mecanismo de transporte activo, sólo los iones cloruro pasan por difusión pasiva. Los azúcares y las proteínas se absorben por mecanismos pasivos, previa degradación a monosacáridos y aminoácidos (Geneser 1984). La transición entre una porción y la otra es difícil de observar macroscópicamente, por lo general se realiza a nivel histológico. En el ratón, considerando al duodeno, yeyuno e íleon, la longitud promedio es de 35cm (Fig. 2) (Cook 1983).

Duodeno

Esta denominación aplicada a la sección proximal del intestino delgado, proviene del griego *dodekadaktylon*, que significa 12 dedos (debido a su longitud en humanos), es la porción mas corta, ancha y fija del intestino delgado (Berk 1987). Esta inicia después del esfínter pilórico que separa al ID del estómago (Fig. 2). Esta porción intestinal rodea la cabeza y el cuello del páncreas (Gartner and Hiatt 1997), y no se encuentra unida al mesenterio. Para efectuar sus funciones digestivas, el duodeno recibe bilis proveniente del hígado y jugos digestivos provenientes del páncreas por los conductos colédoco y pancreático (Gartner and Hiatt 1997). En la submucosa se presentan las glándulas de

Brunner, tuboalveolares ramificadas, los conductos de estas glándulas penetran en la capa muscular de la mucosa y perforan la base de las criptas de Lieberkühn, la secreción de dichas glándulas tiene un pH entre 7 y 8, debido a que contiene iones de bicarbonato, cuya función posiblemente sea proteger a la mucosa duodenal (Geneser 1984).

Yeyuno

Corresponde a la segunda porción intestinal y su nombre deriva del latín *jejunos*, que significa vacío (Moore 1997). Su longitud corresponde a las dos quintas partes proximales del intestino delgado (Fig 2) que está unido al mesenterio, se ubica en la porción superior izquierda de la cavidad abdominal. Comparado con el íleon, el yeyuno presenta una pared mas gruesa y su luz es mas ancha. Esta sección intestinal está suspendida de la pared posterior del abdomen por el mesenterio, con forma de abanico, el cual cuenta con una gran cantidad de ganglios asociados, lo que permite una infiltración constante a la pared intestinal por parte de linfocitos y algunas células mononucleares (Gartner and Hiatt 1997). Este mesenterio se encuentra formado por dos túnicas de peritoneo, entre las cuales corren vasos sanguíneos, colectores linfáticos, nervios y tejido adiposo (Moore 1997).

Ileon

Es la denominación de la última sección del intestino delgado y su nombre proviene del griego *eilein*, que significa retorcer. Su longitud corresponde a las últimas tres quintas partes del intestino delgado mesentérico (Fig 2) (Berk 1987), y se localiza en las fosas ilíacas. Esta sección intestinal, al igual que el yeyuno, se encuentra unida al mesenterio (Moore 1997). Es en esta sección intestinal donde puede observarse la presencia de Placas de Peyer (PP). En el ratón se encuentran en promedio de 9 a 14 PP con un tamaño de 4mm aproximadamente (Cook 1983).

Intestino Grueso

El intestino grueso (IG) está compuesto por ciego, colon, recto y ano. El IG se extiende desde la válvula ileocecal, transición entre el ciego y el colon, hasta el ano, esta clasificación es fundamentalmente anatómica, macroscópica y condicionada topográficamente (Geneser 1984). Su función es absorber la mayor parte del agua y los iones que se encuentran en el quimo que recibe del intestino delgado, de este modo las heces adquieran cierta consistencia (Gartner and Hiatt 1997).

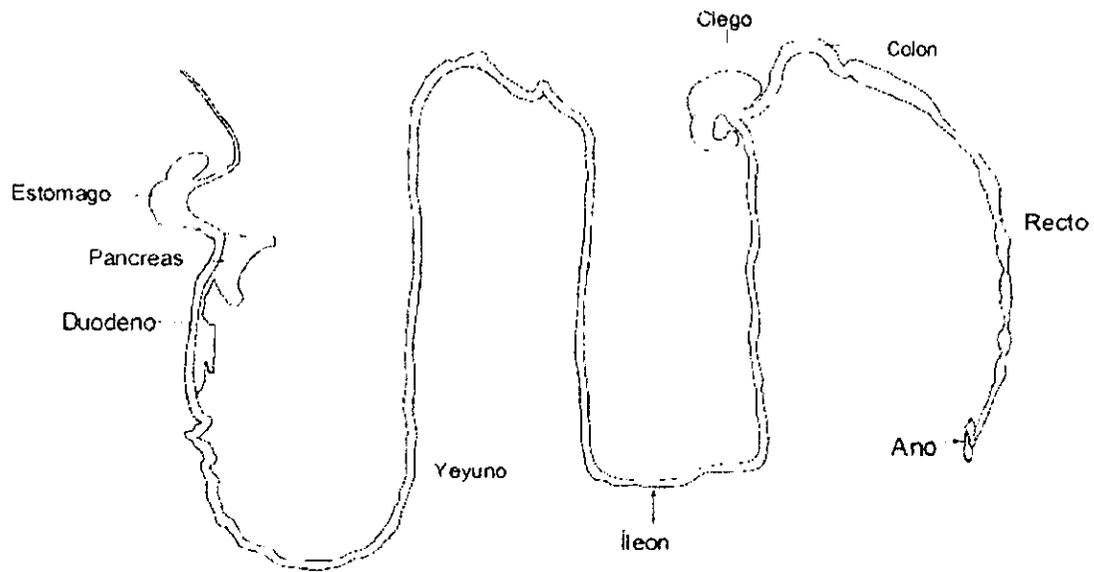


Figura 2. Tracto digestivo de ratón, se observa la longitud y proporción relativa de las secciones anatómicas del intestino delgado y grueso.

Es importante mencionar que la mucosa del intestino grueso no presenta vellosidades, sin embargo continúan las criptas de Lieberkühn, y estas son más largas y rectas que en el intestino delgado (Gencser 1984). En el ratón, el intestino grueso tiene una extensión de 14cm aprox (Fig. 2) (Cook 1983).

Ciego

Esta estructura tiene forma de evaginación alargada, cuya longitud es variable (Fig. 2). Se caracteriza por presentar un engrosamiento de la pared debido a cantidades importantes de tejido linfóide, las cuales forman una capa casi continua de folículos (Gencser 1984).

Colon

Corresponde a la segunda sección del intestino grueso, su nombre proviene del griego *κολλος*, que significa grueso (Fig. 2). La lámina muscular externa es notable debido a que su componente longitudinal no se continúa a lo largo de toda la superficie, sino que remata en tres cintas estrechas de fascículos musculares, conocidos como cintillas o tenias cólicas (Moore 1997). Esta sección del

intestino recibe el quimo a nivel de la válvula ileocecal, además impide el flujo retrógrado del contenido cecal hacia el íleon.

Recto

Corresponde a la porción terminal del intestino grueso, está cubierto parcialmente por peritoneo y carece de mesenterio (Fig. 2). Se localiza en la cavidad pélvica (Moore 1997). La histología del recto es muy similar a la descrita para el colon, salvo que sus criptas de Lieberkühn son más profundas, aunque en menor cantidad por área (Gartner and Hiatt 1997).

Ecología Intestinal

Hasta hace algunas décadas se consideraba que el intestino delgado no presentaba ninguna población de bacterias residentes, debido a que el peristaltismo es uno de los mecanismos de eliminación de estos agentes, sobre todo en dicha porción (Cook 1983).

Sin embargo, en los 70's se describió en el ratón la presencia de una bacteria que soporta las condiciones de dicho ambiente, por medio de una estructura especializada que le permite anclarse en las células epiteliales, especialmente en el íleon distal (Davis and Savage 1974). Su caracterización fue problemática debido a las dificultades para aislarla y cultivarla *in vitro*. Sin embargo, por medio de caracteres morfológicos se clasificó dentro de la familia *Arthromitaceae* y se le ha propuesto un ciclo de vida. El microorganismo corresponde a una bacteria gram-positiva, su tamaño oscila entre 0.7 y 11.8µm de ancho y entre 20 a 80µm de largo (Foster, Small et al. 1983).

No obstante, la mayor dificultad para el aislamiento y la descripción de especies nuevas en el tracto intestinal corresponde a la falta de medios y condiciones de cultivo adecuadas. Actualmente y con el desarrollo de diversas técnicas, se pudo caracterizar la presencia de lactobacilos y estreptococos en el intestino delgado. Además se caracterizó la cinética de aparición y desaparición de estas poblaciones. Las flavobacterias, los enterococos, *Escherichia coli* y algunos bacilos representan poblaciones que aumentan rápidamente, y después de haber alcanzado el pico de población máximo desaparecen abruptamente, mientras que los lactobacilos, estreptococos anaeróbicos y bacteroides persisten como flora residente toda la vida del animal (Dubos, Russell et al. 1965).

En el IG el panorama es totalmente diferente, la mayor densidad y diversidad de especies patógenas y comensales habitan en esta sección intestinal. En ratón se describió que las poblaciones comensales habitan el intestino a partir del 14 día de vida ya que es cuando los animales son capaces de ingerir comida sólida y este cambio en la dieta trae la colonización masiva de estos microorganismos (Brown and Balish 1978). La flora residente está formada por mas de 400 especies diferentes de bacterias, y la mayor parte corresponde a estreptococos, lactobacilos y enterobacterias (Tomohiro and Owen 1994).

Las relaciones ecológicas que se establecen en comunidades como estas son estrechas y complejas, por ejemplo; los productos metabólicos de una especie afectan el crecimiento de las demás e incluso pueden tener un efecto autorregulador (Berk 1987). Así mismo, las relaciones ecológicas que se establecen en el intestino han llevado a ciertas especies que inicialmente eran patógenas a adaptarse al ambiente y establecer una relación simbiótica de tipo comensalista, lo cual sugiere un complejo proceso evolutivo (Dubos, Russell et al. 1965).

Inmunología Intestinal

La mucosa intestinal comprende la superficie mas amplia de contacto con antígenos externos. En el humano, el epitelio intestinal comprende aproximadamente 400m² de superficie, lo cual representa 200 veces la superficie de la piel (Mowat and Viney 1997). Esta superficie se enfrenta continuamente a diversos tipos de antígenos que van desde agentes patógenos (parásitos, bacterias, virus) y comensales (bacterias), hasta el mismo alimento.

Es por ello que la inmunidad intestinal es un sistema finamente coordinado para montar respuestas inmunes de manera rápida y eficiente, además de establecer tolerancia a muchos antígenos incluyendo probablemente los alimentarios. Se considera al tejido linfoide del tracto digestivo como un sistema inmune local, denominado como tejido linfoide asociado al intestino (GALT, del ingles Gastrointestinal lymphoid tissue) (Ventura and Campos 1992). El GALT está integrado por varios compartimientos: placas de Peyer (PP, del ingles Peyer patch), ganglios linfáticos mesentéricos (MLN, del ingles Mesenteric lymph nodes), lámina propia (LP, del ingles lamina propria) y la sección de linfocitos intraepiteliales (LIE) (Macpherson and Liu 1999). En humanos, ratas y ratones, el GALT posee zonas y células eferentes y aferentes. Las PP son zonas aferentes donde se captan antígenos capaces de iniciar respuestas inmunitarias, mientras que los linfocitos de la LP y los LIE son

primordialmente células eferentes, capaces de producir inmunoglobulinas, en particular IgA, aunque también proporcionan inmunidad mediada por células (Ventura and Campos 1992).

Las PP (Fig. 3) son conjuntos de ganglios linfáticos, localizados en la mucosa del intestino. Cada nódulo presenta un centro germinal cercano a la muscularis mucosae y un casquete o corona en contacto con el epitelio. Se forman durante el último tercio de la vida embrionaria mediante la formación de las células T y B (Ventura and Campos 1992). Las PP constan de tres dominios: la zona folicular, la parafolicular y el epitelio asociado al folículo (FAE). El FAE es monoestratificado y forma una interfase entre la asociación linfoide y el lumen intestinal. En este epitelio existe un tipo celular muy particular, denominado células M. Estas células se localizan en el domo de las PP, están rodeadas por células de absorción, y representan el 10% de las células presentes en el FAE (Tomohiro and Owen 1994).

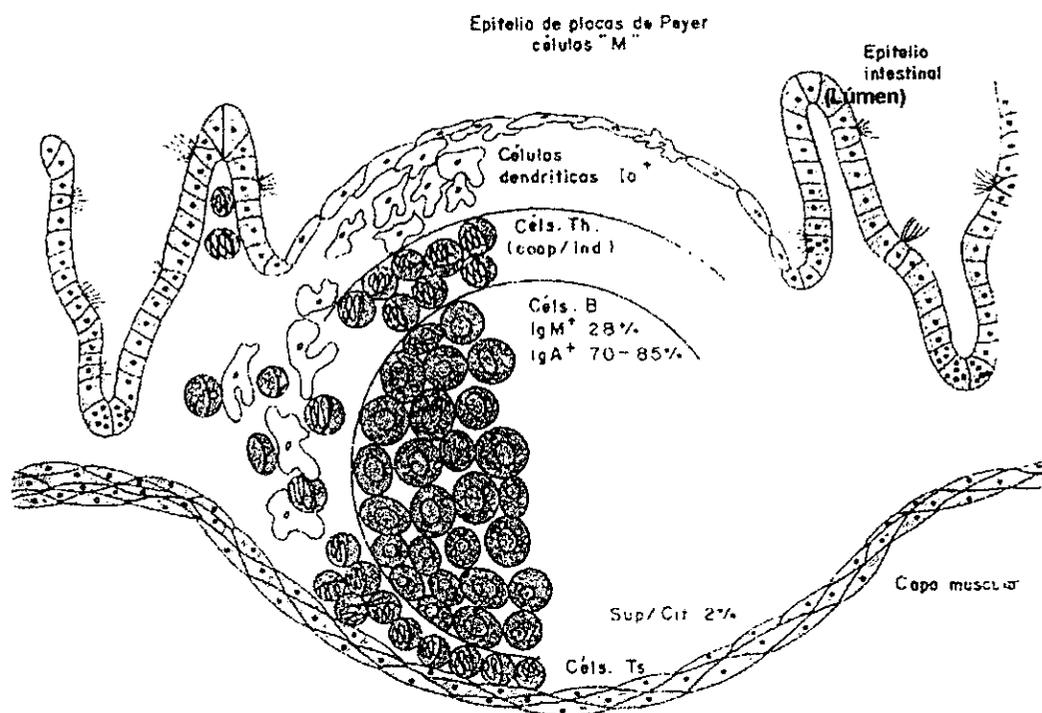


Figura 3. Estructura general las PP donde se observan el FAE y la distribución de los linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas.

La importancia de las células M (Fig. 3) radica en que captan partículas del lumen intestinal y las transportan hacia los linfocitos, macrófagos y DC. Esto se demostró por microscopía electrónica de transmisión (MET) donde se observan en estas células pequeñas vesículas intracitoplasmáticas que transporta sustancias de la luz intestinal hacia los folículos (Ventura and Campos 1992).

En la superficie apical, estas células cuentan con procesos citoplasmáticos mas cortos y en menor número que las vellosidades, los cuales se denominan micropliegues. En esta sección apical las células M cuentan con una gran cantidad de mitocondrias, microvesículas y escasos lisosomas, es por ello que se les adjudica capacidad para transportar los antígenos con poca degradación enzimática. Algunas moléculas y microorganismos para los que se demostró su transporte via células M son: partículas y macromoléculas (ferritina, toxina de cólera, partículas de látex), virus (retrovirus tipo 1 y 3, HIV tipo 1), bacterias (*Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli*) y parásitos (*Cryptosporidium sp.*, *Giardia muris*). Además de transportar antígenos al interior de las PP se demostró cierta actividad de APC a las células M, ya que expresan MHC CII e IL-1 (Tomohiro and Owen 1994).

Respecto al origen de las células M existen dos teorías; la primera postula que se desarrollan a partir de células epiteliales maduras de absorción, las cuales se encuentran encima de las PP. La segunda teoría postula que estas células se diferencian directamente de un tipo de célula progenitora localizada en las criptas adyacentes al domo de la PP (Tomohiro and Owen 1994).

Entre las células del FAE, en la zona subepitelial y la áreas foliculares se encuentran abundantes células dendríticas MHC CII⁺. En el ratón los centros germinales de las PP están poblados por linfocitos B con citoplasma abundante y pálido; de ellos el 80% presentan IgA en su membrana. Por otra parte también se demostró la presencia de linfocitos T, localizados en la región de la corona internodular y la cercana a la capa muscular, donde la mayor parte de ellos presentan un fenotipo del tipo cooperador (Thy 1-2⁺, Lyt 1⁺) (Ventura and Campos 1992).

El siguiente compartimiento del GALT corresponde a los linfocitos intraepiteliales (LIE), donde se encuentran células NK, linfocitos T, células cebadas y macrófagos (Tomasi 1994). Los linfocitos intraepiteliales tienen baja capacidad proliferativa en comparación con linfocitos de otros órganos, funcionalmente presentan actividad citotóxica natural, que está en íntima relación con el contenido de gránulos citoplásmicos. Es posible que esta actividad se vea aumentada en presencia de interferón, debido a ello se propone que estos linfocitos intervienen en defensa contra infecciones virales (Ventura and Campos 1992). Esta baja capacidad proliferativa quizá se relacione con rutas de coestimulación poco usuales, tales como CD2, otra idea es que tal vez estos linfocitos estén ya diferenciados hacia tipos celulares efectores (Mowat and Viney 1997). Una población común en este grupo corresponde a los linfocitos TCR (del inglés T cell receptor) γ/δ , los cuales representan el 50%

de los LIE en el ratón, mientras que en el humano representan sólo el 10%. Su distribución se limita a ciertas zonas como piel, intestino y epitelio genital, además existe una pequeña población en hígado y bazo (Sato, Ohtsuka et al. 1993). Se ha demostrado que estas células tienen origen tanto tímico como extratímico (McVay and Carding 1996). La diversidad de las cadenas γ y δ está determinada por la combinación de diversas secciones de genes (V, D y J para los genes TCR δ y V y J para los genes TCR γ), además de diversas inserciones de nucleótidos y deleciones que ocurren durante el proceso (Kagnoff 1998).

A partir de esta diversidad de genes se generan los linfocitos γ/δ , sin embargo es posible observar un patrón en el uso de gen V en relación al lugar donde se encuentran estas células. Así las células γ/δ de piel son fundamentalmente V γ 5/V δ 1, las de mucosa genital son V γ 6/V δ 1, las de intestino son V γ 7/V δ 4, en timo son V γ 2/V δ 5 y en hígado V γ 1/V δ 6 (Sato, Ohtsuka et al. 1993).

En ratón existe una población γ/δ^+ dendrítica en la piel, su función aún no es clara, sin embargo se cree que reconoce ciertos antígenos comunes en los epitelios e inicia respuestas rápidas contra un número limitado de agentes (Abbas, Lichtman et al. 1997). Estas células son denominadas células T dendríticas epidérmicas (DETC, del inglés Dendritic epidermal T cells) e inicialmente se conocieron como células Thy-1⁺. Se encuentran localizadas en la lámina basal de los keratinocitos (Tigelaar and Lewis 1995). La morfología dendrítica de estas células es lo que las hace particulares, ya que solo se han reportado células Thy-1⁺ dendríticas en piel, mucosa bucal y en menor densidad en esófago. Hasta la fecha no se han encontrado células Thy-1⁺ con morfología dendrítica en intestino, con lo cual se propone que la morfología dendrítica solo se presenta en epitelios estratificados y no en epitelios simples como el intestinal (Cohen, Alves et al. 1987).

De estas poblaciones que se encontraron en diferentes mucosas, algunos estudios se abocaron a establecer si existen diferencias entre ellas o no, basados en la expresión de diversos marcadores. Un estudio en ratón sugiere que es posible clasificarlas en tres grupos: γ/δ hepáticas, γ/δ tímicas y γ/δ IEL (Sato, Ohtsuka et al. 1993).

En el intestino humano adulto, por cada célula γ/δ hay entre 20-100 células epiteliales, esta distribución y la naturaleza oligoclonal quizá deben ser considerarse para entender su función. En el ratón la proporción de células γ/δ intestinales varía entre 20% y 80% dependiendo de las circunstancias ambientales (Mowat and Vincy 1997). Debido a su localización entre las células epiteliales se cree que

una de sus funciones es servir como primera línea de defensa ante los antígenos intestinales. En el caso del ratón esta función se demostró ante patógenos como *Listeria sp.*, *Mycobacteria sp.*, *Plasmodium sp.* y *Toxoplasma sp.* (Kagnoff 1998). Otros estudios sugieren que las células $\gamma\delta$ juegan un papel en el desarrollo de las células B productoras de IgA y en la diferenciación de las células epiteliales (Fujiashi, Kawabata et al. 1996). Otros grupos proponen la posibilidad de que estos linfocitos reconozcan proteínas de choque producidas por las células en estado de stress, y proteínas de micobacterias en el contexto de las porciones no polimórficas del MHC CI (Born, Happ et al. 1990; Berber 1992; Groh, Steinle et al. 1998).

En la lámina propia existen diversos grupos de células, uno de los más estudiados son los macrófagos. Estas células tienen una distribución preferencial en la cresta de las vellosidades. Manifiestan características de células fisiológicamente maduras como son; granularidad citoplásmica, adherencia al vidrio mas duradera y mayor capacidad fagocítica para esferas de látex (Ventura and Campos 1992). Contienen diversas vesículas fagocíticas e incluso cuerpos apoptóticos. En cuanto a su funcionalidad, por MET se ha demostrado contacto con linfocitos CD4+, lo cual sugiere cierta actividad como APC, aunque *in vitro* no se ha podido demostrar (Nagashima, Maeda et al. 1995). Además, se comprobó su capacidad para secretar enzimas, mediadores químicos y factores de actividad diversa. Finalmente, los macrófagos del intestino delgado son capaces de ingerir sustancias carcinogénicas, hecho postulado como factor que disminuye la frecuencia de tumores a este nivel, en comparación con el intestino grueso (Ventura and Campos 1992).

También están presentes linfocitos B, los cuales provienen de las PP para diferenciarse en células plasmáticas productoras de IgA e IgE. Se ha propuesto que los linfocito B se dirigen a la mucosa por tropismo mediante factores aún desconocidos y un componente quimotáctico producido localmente. En lo que respecta a los linfocitos T, estas células se encuentran en la mucosa intestinal únicamente después del reto antigénico. La función de los linfocitos supresores en la lámina propia es regular la producción de IgM e IgG locales, aunque después de repetidas exposiciones al antígeno por vía oral también se suprime la producción de IgA (Ventura and Campos 1992). Los macrófagos poseen una baja capacidad proliferativa, aunque secretan grandes cantidades de citocinas efectoras como IFN γ , IL4 e IL5, además cuentan con otras funciones, así las células CD8+ y CD4+ poseen cierta actividad citolítica, probablemente relacionada con la expresión del ligando de Fas (Mowat and Viney 1997).

Es importante mencionar que en el ratón las células epiteliales también desempeñan funciones inmunológicas ya que expresan moléculas MHC CII y tienen capacidades de APC (Ventura and

Campos 1992). Diversos estudios han demostrado la capacidad de estas células de presentar antígenos *in vitro* a linfocitos T periféricos (Berber 1992). Esta capacidad se adjudica a la expresión de diversas moléculas en su superficie apical, las cuales pueden funcionar como “receptores de antígeno” tales como CD205 (DEC-205). Además, también expresan moléculas de coestimulación como CD58. Diversos estudios realizados por Groh *et al.*, demuestran que estas células cuentan con moléculas MHC CI no clásicas como MICA y MICB, las cuales pueden estimular linfocitos T del tipo $\gamma\delta$ (Hershberg and Mayer 2000).

Células Dendríticas

Hasta hace unos años el campo de la inmunología se había enfocado fundamentalmente a dos componentes de la respuesta inmune: los antígenos y los linfocitos, sin embargo existe otro elemento muy importante, el sistema de las células presentadoras de antígeno (Banchereau and Steinman 1998). Dentro de éstas destacan las células dendríticas por sus capacidades no solo de presentación sino de coestimulación y de producción de citocinas (Steinman 1999).

Estas células fueron descritas por primera vez en 1868 por Paul Langerhans en la piel, sin embargo no se les relacionó con ninguna función inmune. No fue sino hasta 1973 cuando Ralph Steinman las describe como células accesorias presentes en bazo de ratón. Utilizando suspensiones celulares seleccionaba las células adherentes a vidrio o plástico; dentro de este grupo se encontraban granulocitos, linfocitos, mononucleares y un grupo de células que presentaban prolongaciones citoplasmáticas a manera de pseudópodos los cuales se retraen y extienden constantemente. Es por ello que se les designó como “Células Dendríticas”, además presentaban un núcleo irregular, escasos lisosomas y una baja actividad endocítica tanto *in vivo* como *in vitro* (Steinman and Cohn 1973) Es aquí donde por primera vez se les relaciona con el sistema inmune, y desde entonces una ardua investigación se ha llevado en torno a ellas para conocer su funcionalidad y papel precisos dentro de la respuesta inmune. Tan solo un año después se demostró que el origen de estas células era de médula ósea y que las células que se aislaban de bazo aparentemente no se dividían (Steinman, Lustig et al. 1974).

Estas células una vez originadas en la médula ósea se dispersan por la vía sanguínea a tejidos no linfoides periféricos como la piel, traquea, vagina, esófago e intestino, entre otros, donde se desarrollan en un estado considerado de inmadurez inmunológica (Fig. 4). Este se caracteriza por una alta capacidad de captación y procesamiento de antígenos (Tabla 1). Posteriormente, mediadores

inflamatorios o productos microbianos estimulan la migración de dichas células por los vasos linfáticos hacia el órgano linfóide más cercano, donde son capaces de presentar dichos antígenos eficientemente en las zonas de linfocitos T, en esta etapa las células se consideran maduras (Fig. 4) (Cella, Sallusto et al. 1997). De este modo se pueden distinguir ciertas características básicas para ambas:

<i>Células Dendríticas Inmaduras</i>	<i>Células Dendríticas Maduras</i>
Altos niveles de vesículas citoplasmáticas ricas en moléculas MHC C-II (Ossevoort, Kleijmeer et al. 1995). Poca o nula expresión de moléculas de coestimulación (Steinman 1991).	Alta expresión en membrana de moléculas MHC C-II. Presencia de moléculas de coestimulación tales como CD58, ICAM-1, CD54, CD86 (Banchereau and Steinman 1998).
Alta capacidad de macropinocitosis para internalizar solutos y llevarlos a las vesículas ricas en MHC C-II (Steinman and Swanson 1995). Receptores FC γ y FC ϵ presentes (Banchereau and Steinman 1998). Presencia de receptores que median endocitosis como la lectina tipo C, el receptor de manosa y Dec-205 (CD-205) (Banchereau and Steinman 1998)	Baja capacidad endocítica y de receptores Fc (Banchereau and Steinman 1998).
Pobre actividad de estimulación para linfocitos T vírgenes (Steinman 1999).	Potente actividad estimuladora para linfocitos T vírgenes (Steinman 1999).

Tabla 1. Características generales que definen a las DC maduras e inmaduras.

Considerando lo anterior, algunas de las principales funciones de las células dendríticas son:

- ∞ Actúan como centinelas *in vivo*, ya que presentan una distribución que optimiza la captación de antígenos exógenos y la migración al órgano linfóide más cercano, optimizando así la selección clonal de los escasos linfocitos T CD4 y CD8 antígeno específicos.
- ∞ Son las iniciadoras de la respuesta inmune, estimulando tanto a linfocitos T vírgenes como a B.
- ∞ Inducen tolerancia (Banchereau and Steinman 1998).

De este modo las células dendríticas integran todo un sistema que, de acuerdo con su localización se puede dividir en tres secciones; células distribuidas en órganos no linfoides (células de Langerhans e intersticiales), células en circulación (células veladas) y células en los tejidos linfoides (interdigitantes y foliculares) (Steinman 1991).

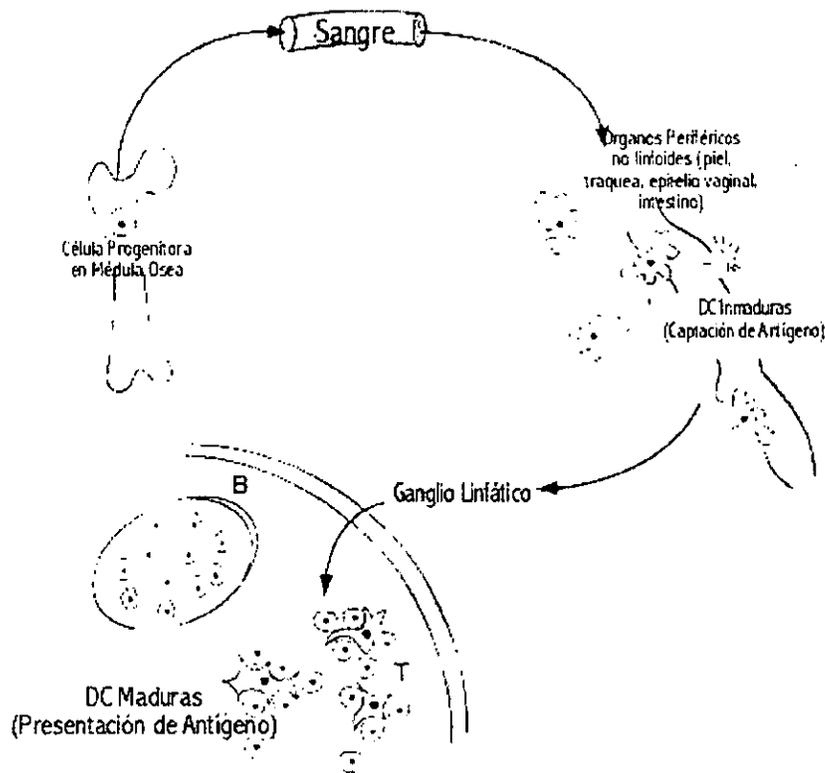


Figura 4. Desarrollo y funcionalidad de las células dendríticas.

Células Dendríticas en Órganos no Linfoides

Las DC más estudiadas son las células de Langerhans, ampliamente caracterizadas en ratón y humano, aunque han sido descritas también en otros organismos. Estas células se caracterizan por ciertas estructuras subcelulares que se observan por microscopía electrónica, llamadas gránulos de Birbeck, con forma de raqueta de tenis, cuya función precisa aún no se conoce (Steinman 1999).

Existen evidencias sólidas de la gran capacidad de migración de estas células; usando isotiocianato de fluoresceína (FITC) como antígeno cutáneo se han observado células dendríticas marcadas con el fluorocromo en el ganglio linfático más cercano, después de 24hrs (Cumberbatch and Kimber 1990). La funcionalidad de estas células se ha demostrado ampliamente y actualmente existe investigación para reconocer su papel en enfermedades infecciosas cuya transmisión podría realizarse a través de piel por ejemplo leishmaniosis y dengue (Konecny, Stagg et al. 1999; Wu, Grouard-Vogel et al. 2000), así como para su uso en tecnologías tales como el desarrollo de vacunas cuya aplicación sea cutánea (Fan, Lin et al. 1999).

Sin embargo las células dendríticas no sólo se han descrito en piel sino también en mucosas y otros tejidos, en esos casos se les denomina como células intersticiales. Por ejemplo, en las vías respiratorias se han caracterizado principalmente en rata donde, usando cortes oblicuos de tráquea e inmunohistoquímica con marcadores como MHC CII y OX6 (Ia) se ha demostrado la presencia de células positivas con morfología dendrítica en contacto con la lámina basal y la base del epitelio (McWilliam, Napoli et al. 1996). Además, se ha observado el aumento en la densidad de dichas células cuando las ratas son expuestas a lipopolisacárido (LPS) en aerosol, variando de 600cel/mm² a 1000cel/mm² en tan solo 24hr, lo que sugiere un papel importante en la patogénesis y la respuesta inflamatoria de vías respiratorias (McWilliam, Stumbles et al. 1999).

La primera descripción de estas células en la mucosa genital femenina fue en 1968, y a partir de entonces se han llevado a cabo numerosos estudios tanto en cérvix como en úteros normales y con alguna patología. Estas células se caracterizan por presentar los siguientes marcadores; HLA-DR, CD1a, CD1c, S-100, y son positivas en la prueba de ATPasa de membrana (esta es una prueba enzimática que evidencia la presencia de esta proteína en membrana, su importancia radica en que las células epiteliales no la presentan, por lo que es un buen marcador para las DC). Se localizan en las zonas basal, parabasal e intermedia de las capas de keratinocitos. La densidad normal de estas células en el exocervix es 511+/-89 cel/mm² (Larregina and Morelli 1999). Algunas de las posibles líneas de investigación a seguir con estas células es su potencial participación en enfermedades tales como el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y el virus del papiloma humano (HPV).

En el intestino estas células se han caracterizado usando dos estrategias; por medio de cortes transversales, realizando inmunohistoquímica (Mayrhofer, Pugh et al. 1983; Wilders, Sminia et al. 1983; Soesaty, Biewenga et al. 1990; Maric, Holt et al. 1996) o realizando suspensiones celulares que se analizan por citometría de flujo (Pavli, Woodhams et al. 1990; Pavli, Hume et al. 1993; Liu and Macpherson 1995). Los resultados que corresponden a la primera estrategia sugieren la presencia de "marca" positiva para moléculas como MHC CII y OX6 (Ia), por lo que algunos autores argumentan que una caracterización *in situ* resulta difícil (Macpherson and Liu 1999). Mientras que los estudios realizados por medio de suspensiones celulares revelan la presencia de una población positiva para distintos marcadores y cuya funcionalidad se demostró por medio de MLR (Pavli, Woodhams et al. 1990, Pavli, 1993)

El interés de estudiar este tipo de células en intestino radica en que este es uno de los tejidos con mayor exposición antigénica, y lo más notable es que no parece iniciarse una respuesta inmune

activa contra todos los antígenos presentes. Los mecanismos inflamatorios, de captación de antígenos y de tolerancia para algunos de ellos, son aspectos interesantes de estudiar sobre la funcionalidad de estas DC.

Sin embargo no sólo en mucosas se han descrito células dendríticas, también existen en órganos parenquimatosos como el hígado, riñón, corazón y páncreas. La importancia de este tipo de células en tejidos como estos se desconoce, aunque se propone que pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del tejido, lo cual nos lleva a preguntarnos qué sucede en el caso de alguna patología en estos órganos (Steptoc and Thomson 1999).

Células Dendríticas en Circulación

Las células veladas son células dendríticas que se localizan en los vasos linfáticos aferentes, se caracterizan por la extensión de procesos citoplasmáticos, alta expresión de moléculas MHC CII y actividad de presentación de antígeno. Han sido descritas en conejo, cerdo, ratón, rata, humano y borrego. Además de las células veladas en linfa, existe una proporción de células dendríticas circulantes las cuales en el humano representan menos del 0.1% (Steinman 1991).

Células Dendríticas en Órganos Linfoides

Dentro de los tejidos linfoides periféricos existen al menos dos regiones características; la zona de linfocitos T y la de linfocitos B, en donde los linfocitos T y B residen y circulan constantemente. En las zonas de B se encuentran las células dendríticas foliculares, las cuales retienen antígeno en forma de complejos inmunes e intervienen en el desarrollo de los centros germinales de células B (Mandel, Phipps et al. 1980). Mientras que en las zonas de T se encuentran las células dendríticas interdigitantes, inicialmente descritas en una tesis de doctorado en 1970 (Veldman, J.E. 1970. *Histophysiology and Electron Microscopy of the Immune Response*, Steinman, 1991). Algunos de los marcadores presentes en estas células son CD205 (DEC-205), CD68, CD40, CD86, CD8, ligando de Fas, CD11c (Steinman, Pack et al. 1997).

Linajes de Células Dendríticas

Desde hace algunos años se ha aceptado de manera general el hecho de que las DC corresponden a APC de diferentes linajes. Actualmente se ha demostrado que las DC pueden

diferenciarse de diversos tipos de progenitores, que diferentes tipos de DC pueden ser generadas del mismo progenitor y que diferentes grupos de DC *in vivo* se encuentran en sangre (humano) o en bazo (ratón) (Grabbe, Kämpgen et al. 2000).

Diversos estudios han demostrado la existencia de un precursor mieloide tanto en humanos como en ratón (Fig. 5). En humanos se ha descrito un precursor CD34⁺ de médula ósea, que bajo la influencia de GM-CSF y TNF- α genera células con antígeno linfocítico cutáneo (CLA⁺, del inglés Cutaneous lymphocyte antigen), las cuales expresan rápidamente CD1a, proliferan y se diferencian bajo la influencia de TGF- β hacia DC con características de células de Langerhans. Por otro lado, estas mismas células CD34⁺ puede diferenciarse a células CD14⁺, las cuales presentan el receptor de M-CSF, y en presencia de M-CSF se diferencian a macrófagos, mientras que en ausencia de éste proliferan y se diferencian a DC de tipo intersticial que expresan CD1a⁺, CD2⁺, CD9⁺ y CD68⁺ (Vandenabeele and Wu 1999). En el ratón el precursor de médula ósea se diferencia en presencia de GM-CSF, TNF- α y CSF (Fig. 5), generando células que se distinguen por la expresión de CD11b (Mac-1). Las células CD11b (Mac-1)⁺ expresan, al igual que en humano, el receptor de M-CSF, dando origen tanto a macrófagos como a DC, mientras que las células CD11b (Mac-1)⁻ se diferencia a células tipo Langerhans, expresando E-cadherina (Zhang, Zhang et al. 1999).

Además, actualmente se acepta que los monocitos sanguíneos humanos CD14⁺ sean capaces de diferenciarse en presencia de GM-CSF e IL-4 a células con características de DC inmaduras (alta capacidad endocítica y fagocítica) después de 5 a 7 días de cultivo (Cella, Sallusto et al. 1997). Sin embargo, en presencia de M-CSF estas células pueden diferenciarse a macrófagos. Por otra parte, si estos mismos precursores monocíticos se tratan con GM-CSF, IL-4 y TGF- β , son capaces de generar células tipo Langerhans, que expresan E-cadherina y gránulos de Birbeck (Vandenabeele and Wu 1999).

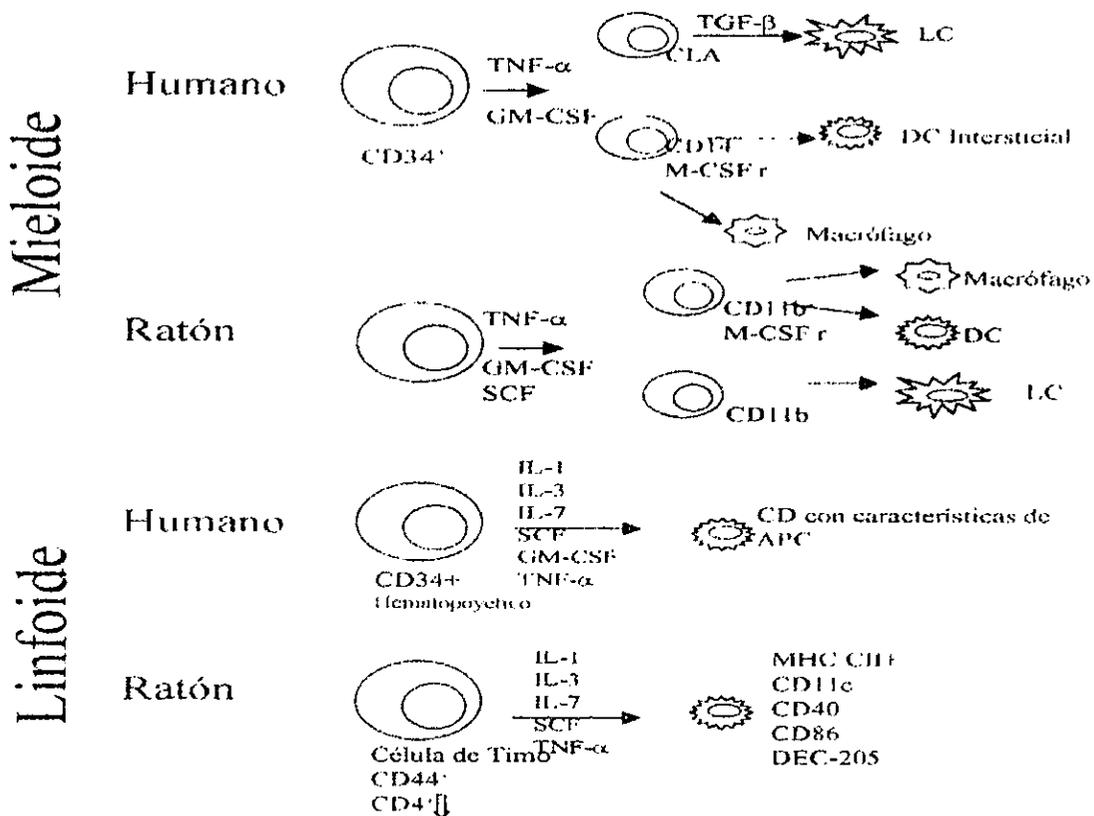


Figura 5. Desarrollo del linaje mioelide y linfoide de células dendríticas en ratón y en humano, haciendo referencia a las citocinas o factores relacionados.

Las principales evidencias del linaje linfoide se apoyan en estudios en ratón (Fig. 5) (Cella, Sallusto et al. 1997). A diferencia de las células precursoras de médula ósea, el precursor tímico expresa CD44, c-KIT y bajos niveles de CD4, por lo que se ha designado como precursor "CD4 bajo". Cuando estas células son tratadas con IL-1, IL-3, IL-4, IL-7, SCF, GM-CSF y TNF- α , se da una diferenciación del 70% de estas células precursoras a DC. Omitiendo una por una estas citocinas, se demostró que las fundamentales para la diferenciación son: IL-1, IL-3, IL-7, SCF y TNF- α , obteniendo DC con el siguiente fenotipo: MHC CII⁺, CD11c⁺, CD40⁺, CD86⁺ y CD205⁺ (DEC-205). Un hecho destacable es que el GM-CSF no es necesario para diferenciar DC linfoides en el ratón ni en el humano, mientras que parece ser el factor decisivo para su diferenciación en el caso del linaje mioelide. (Vandenabeele and Wu 1999)

En humanos, la existencia de un precursor linfoide está demostrada por a los estudios de diferenciación de progenitores hematopoyéticos CD34⁺, los cuales expresan HLA-DR y CD38 (Fig. 5). Bajo el estímulo de IL-1, IL-3, IL-7, SCF, GM-CSF y TNF- α , éstos se diferencian hacia DC sin

proliferación significativa. Este linaje es considerado linfoide debido a su capacidad de producir tanto células T, B y NK pero no células fagocíticas mieloides. La búsqueda del precursor tímico de DC en humanos aún esta en proceso, debido a que el precursor que se encontró tiene la capacidad de diferenciarse tanto a linaje mieloides como a linfoide. Sin embargo, bajo el estímulo de las citocinas usadas en ratón se han podido diferenciar DC linfoides (Vandenabeele and Wu 1999).

Actualmente se ha descrito en humano un tipo celular particular llamado T plasmacitoide (PTC, del inglés Plasmacitoid T cell), el cual comparte características con células plasmáticas, linfocitos T y monocitos, y se propone como un precursor linfoide para DC en humanos. Las PTC corresponden a un tipo especial de célula que se encuentra en las zonas de T en órganos linfoides y han sido descritas en amígdalas, sangre periférica, cordón umbilical y médula ósea fetal. En lo que se refiere a su fenotipo expresan CD4 (marcador de T), CD68, CD36 (marcador de monocitos) y CD15 (marcador de granulocitos) y por MET presentan una morfología característica muy similar a la reportada para las células plasmáticas (CP) (Vandenabeele and Wu 1999).

Cuando estas células aisladas de amígdalas son cultivadas con IL-3 y CD40L se diferencian a DC que expresan altos niveles de MHC CII, CD40, CD80 y CD86. Es importante mencionar que estas células presentan un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi muy desarrollado lo cual sugiere que corresponden a células diferenciadas con una alta actividad de secreción, como las CP, ésta es una de las actividades funcionales atribuidas a estas células (Grouard-Vogel, Rissoan et al. 1997).

Actualmente se ha postulado la posibilidad de que estos dos linajes realicen funciones diferentes (Cella, Sallusto et al. 1997). En ratón se cuenta con cierta evidencia que indica que las células del linaje linfoide inducen respuestas de tipo Th1, mientras que las células del linaje mieloides inducen respuestas Th2. En contraste en humano el sistema linfoide/plasmacitode genera respuestas Th2, y el linaje mieloides genera respuestas Th1 (Grabbe, Kämpgen et al. 2000).

Sin embargo, a pesar de toda la investigación en este campo, aún no está claro cuál es la relación entre los precursores y las células distribuidas *in situ* en las mucosas, órganos linfoides y circulación (Grabbe, Kämpgen et al. 2000). Las células de Langerhans constituyen el mejor ejemplo de la falta de correspondencia con las clasificaciones *in vitro*, existe evidencia de que estas células pueden diferenciarse de precursores tanto linfoides como mieloides (Vandenabeele and Wu 1999).

Estimulación de Linfocitos T

Las DC están involucradas en muchas funciones de los linfocitos T, de hecho se ha propuesto que estas son las únicas APC capaces de estimular linfocitos T vírgenes, y linfocitos en reposo (Ni and O'Neill 1997). Se han realizado diversos ensayos para probar la capacidad de estimulación de las DC hacia los linfocitos T, la más usada es la prueba de Reacción mixta de leucocitos (MLR, del inglés Mixed Leukocyte Reaction) la cual es un modelo *in vitro* del reconocimiento de moléculas MHC alogénicas y se usa como prueba final para comprobar la compatibilidad de ciertos tejidos (Abbas, Lichtman et al. 1997). En esta prueba, los leucocitos de un individuo (el donador) se mezclan con células del receptor. Si el donador y el receptor tienen moléculas MHC diferentes las células T comienzan a proliferar liberando citocinas y desarrollándose a linfocitos T citotóxicos. Normalmente esta prueba se realiza con un número igual de células del donador y el receptor, sin embargo en el caso de las DC, con sólo una de ellas es posible estimular entre 100 y 3000 células T (Banchereau and Steinman 1998). Actualmente la reacción de MRL es el ensayo más usado *in vitro* para demostrar la funcionalidad en las DC, ya que se inducen tanto CD4⁺ (cooperadores) como CD8⁺ (citotóxicas) (Steinman 1999). Solo las DC maduras y los linfocitos B activados son capaces de estimular a los linfocitos T en esta prueba, aunque las DC en mayor proporción (Ni and O'Neill 1997).

La estimulación óptima de las células T requiere de dos señales provistas por la APC:

- ✓ La interacción péptido MHC/TCR. ("señal 1")
- ✓ Señales coestimuladoras. {B7-1, ICAM-1} ("señal 2")(Dubey, Croft et al. 1995)

Dentro de las moléculas de coestimulación en DC de ratón y humano se expresa la proteína B7 (CD80/CD86), ICAM-1 (CD54) y LFA-3 (CD58) (Ni and O'Neill 1997). *In vivo* se han realizado diversos experimentos para demostrar la capacidad de las DC para estimular a los linfocitos T, comparándolas con macrófagos y células B activadas. Los resultados ponen de manifiesto que las DC son la población más importante en la estimulación (Levin, Constant et al. 1993).

Además de contar con las moléculas de coestimulación las DC presentan entre 10 y 100 veces más moléculas MHC y complejos MHC/péptido antigénico en membrana, que otras APC. Aunado a lo anterior, las DC son capaces de resistir el efecto supresor de la IL-10, sintetizando altos niveles de IL-12, la cual intensifica tanto la inmunidad innata como la adquirida (Banchereau and Steinman 1998).

Caracterización en Intestino

En el intestino las DC se han descrito en las Placas de Peyer (PP), Ganglios Linfáticos Mesentéricos (MLN) y en Lámina Propia (LP), aunque su caracterización completa aún está en proceso.

En la LP, las DC se identifican por criterios morfológicos e inmunohistoquímicos (el marcador más usado es MHC CII) en todas las regiones intestinales. Sin embargo la expresión de MHC CII y morfología irregular no son características suficientes para la identificación de este tipo celular particular (Macpherson and Liu 1999). Se han realizado diversos estudios en rata (Mayrhofer, Pugh et al. 1983; Maric, Holt et al. 1996), ratón (Soesaty, Biewenga et al. 1990), cerdos (Wilson, Haverson et al. 1996), y humanos (Pavli, Hume et al. 1993), identificando una población de células MHC CII⁺ localizada por debajo de la lámina basal del epitelio, que se extiende a manera de red en toda la lámina propia. Además, estudios de ontogenia en rata demuestran células MRC OX4⁺ (Ia⁺) con morfología dendrítica en la lámina propia desde los 18 días de gestación (Mayrhofer, Pugh et al. 1983). La importancia de estas células radica en que posiblemente lleven a cabo dos funciones: la adquisición antigénica y transporte hasta un ganglio y la reestimulación de linfocitos T de memoria en la misma LP (Macpherson and Liu 1999).

Existen reportes de células MHC CII⁺ en LP de perro, donde el mayor número de células marcadas se observa hacia la base de las vellosidades (Elwood, Hamblin et al. 1997). En el humano se ha demostrado que los macrófagos se localizan justo por debajo del epitelio, mientras que las DC forman una red en la lámina propia y que estas células son más abundantes hacia la base de las criptas (Kelsall and Strober 1996).

En ratón existen descripciones amplias sobre las poblaciones de macrófagos y DC en la mucosa intestinal, en las que se demuestra una gran diversidad de subpoblaciones de estos tipos celulares. Las células se distribuyen principalmente en la lámina propia, y una de las poblaciones, la CD11b (Mac-1)⁺ se encuentra en la submucosa (Soesaty, Biewenga et al. 1990). Cabe aclarar que todos estos trabajos se realizaron utilizando cortes clásicos transversales de tejido congelado. Los estudios de microscopía de óptica y electrónica también han aportado información que permite diferenciar este tipo celular, el cual posee un núcleo irregular, un anillo de heterocromatina y casi no presentan vesículas (Pavli, Hume et al. 1993), además hasta el momento no se les han observado gránulos de Birbeck (Ruedl, Rieser et al. 1996)

Justificación

Las DC son las APC mas potentes que se conocen (Steinman 1991), y se encuentran distribuidas estratégicamente para la captación de antígenos externos en la mayoría de las superficies de contacto (piel, mucosa intestinal, epitelio genital, mucosa respiratoria, etc.)(Steinman 1999). En piel, su estudio se ha facilitado gracias a la técnica de obtención de láminas epidérmicas con EDTA, con la cual es posible separar la dermis de la epidermis y en ésta, por inmunohistoquímica se observa una población de aproximadamente 800 DC/mm² (Heras 2001) ya que cuando se trabaja con cortes transversales de piel, sólo se observan unas pocas marcas, dependiendo del corte.

Considerando la cantidad y diversidad de antígenos a los cuales la mucosa intestinal está expuesta, resultad de interés estudiar a las APC de este lugar. La entrada de dichos antígenos hasta las APC se da por dos vías principalmente: PP y por el mismo epitelio (Ventura and Campos 1992). En intestino se han descrito DC en tres sitios: LP, PP y vasos linfáticos (Macpherson and Liu 1999).

En LP, los estudios *in situ* fueron realizados con cortes clásicos, lo que solo permite la observación de ciertas marcas positivas pero no muestran una morfología celular definida (Mayrhofer, Pugh et al. 1983; Soesatyo, Biewenga et al. 1990; Pavli, Hume et al. 1993; Maric, Holt et al. 1996; Wilson, Haverson et al. 1996), por lo mismo no se ha podido establecer su densidad celular por área en este tejido.

Considerando lo anterior se decidió intentar adaptar la técnica de separación de láminas epidérmicas en piel para el tejido intestinal, con el objetivo de buscar una población mas amplia de DC de las ya descritas en intestino.

Objetivo General

- Identificar poblaciones MHC C-II' *in situ* en láminas intestinales y determinar su distribución en ratones de las cepas Balb/c, C57BL/6 y CD40L-/-.

Objetivos Particulares

- Estandarizar la técnica de separación de láminas epidérmicas para su uso en intestino.
- Determinar la posible existencia de DC en láminas intestinales, así como su ubicación precisa en las mismas.
- Caracterizar a estas células con diferentes marcadores por inmunohistoquímica.
- Determinar la densidad celular por área en el intestino delgado y grueso.
- Comparar los valores obtenidos para cada una de las cepas de ratones estudiadas.

Material y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones Balb/c, C57BL/6 y CD40L-/- libres de parásitos intestinales, proveídos por el bioterio del CINVESTAV. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Obtención de Láminas Intestinales

Una vez sacrificado el animal se colocó en posición dorsal y se le realizó una incisión en la porción anal, a partir de la cual se disectó con ayuda de un bisturí a todo lo largo del abdomen, dejando al descubierto los órganos internos. Posteriormente se abrió el peritoneo y se localizó al estómago, después del esfínter pilórico se realizó el primer corte y se separó el mesenterio hasta encontrar el recto, donde se realizó el segundo corte.

El intestino separado se colocó en solución salina (SS) al 0.85% para su manipulación. Se retiraron los restos de mesenterio y el intestino se extendió cortó en secciones de aproximadamente 4cm; las cuales se abrieron "en canal" dejando expuesto el contenido intestinal (Fig. 6). Estas muestras de 4cm se clasificaron según el siguiente criterio; considerando que la longitud promedio del intestino delgado corresponde a 35cm (Cook 1983) y las secciones cortadas fueron de 4cm se obtenían 9 de las cuales, la primera se consideró duodeno, las 4 siguientes yeyuno y las 4 restantes ileon, el intestino grueso en promedio mide 14cm (Cook 1983) y no se dividió. Las muestras se limpiaron para eliminar todo el contenido y se colocaron en ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 0.5M (pH 7.4) por 30min para el intestino delgado y 45min para el grueso, a 37°C (Fig. 6).

Después de la incubación se les retiró el EDTA a las muestras y se lavaron por 10 min. en solución salina 0.85%. Posteriormente se separaron las láminas intestinales por tracción con ayuda de pinzas finas y un bisturí, obteniéndose dos láminas; la externa ubicada hacia el lumen intestinal y la interna, hacia la serosa (Fig. 6).

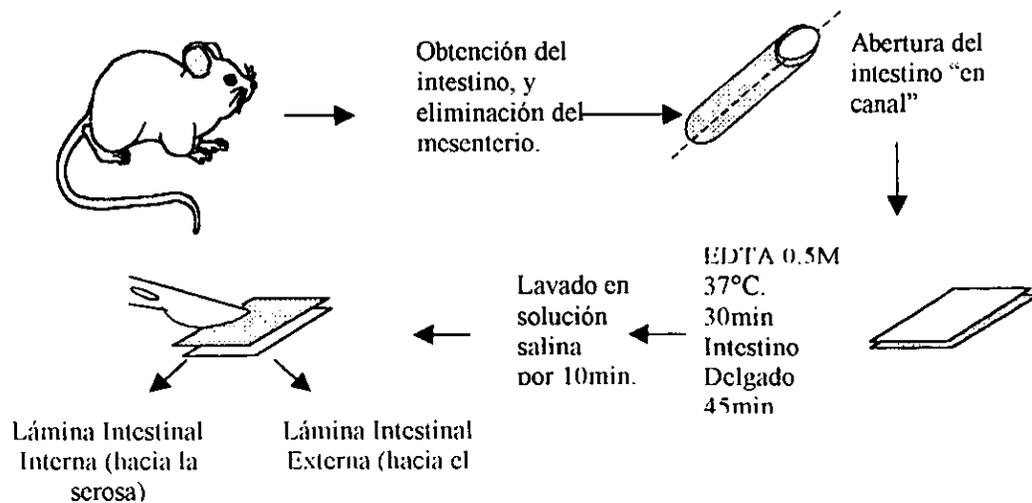


Figura 6. Diagrama de flujo que ilustra la metodología que se usó para la obtención de las láminas intestinales.

Ambas láminas intestinales se fijaron con acetona (Productos Químicos Monterrey) fría por 20min, se lavaron 2 veces en S.S. y posteriormente se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena saturando la enzima con peróxido de hidrógeno al 3%, durante 20 min. a temperatura ambiente. Por último y a modo de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a utilizar, se utilizó suero de chivo al 1% como bloqueador durante 40min. a temperatura ambiente (Fig. 7).

Inmunohistoquímica

Los anticuerpos primarios que se usaron para la caracterización celular fueron los siguientes:

Anticuerpo monoclonal de rata anti-MHC CII de ratón, proviene del hibridoma de rata NIMR4, amablemente proporcionado por el Dr. Leopoldo Santos, del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, el cual se usó en una dilución de 1:100. El isotipo al que corresponde es $\gamma 2b$.

Anticuerpo monoclonal de rata anti-Thy-1 de ratón, ATCC. No. de Catalogo TIB-238. Proveniente de un hibridoma (M5/49.4.1) de rata. La línea celular utilizada para inmunizar es linfoblasto. Se usó a una dilución de 1:80. El isotipo corresponde a $\gamma 2b$.

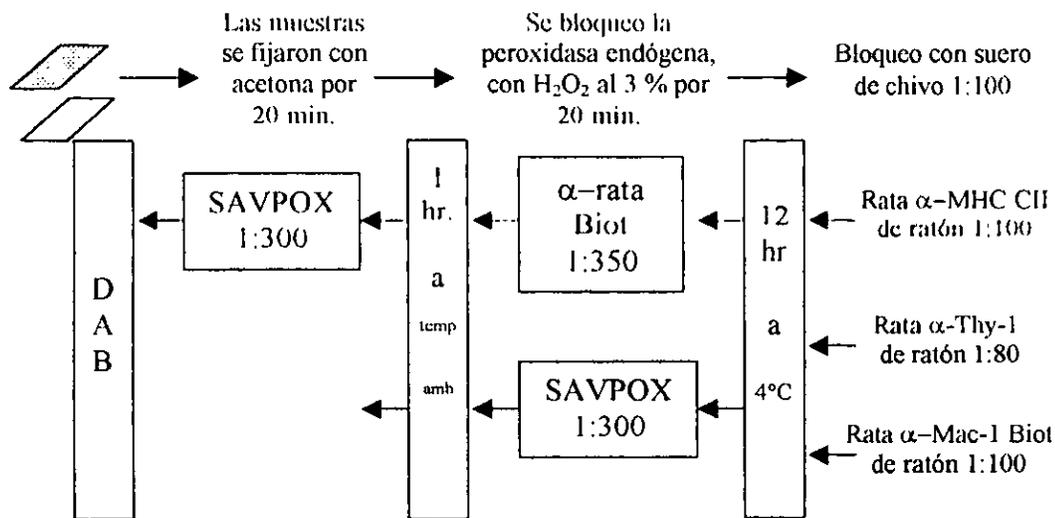


Figura 7. Diagrama de flujo que ilustra la inmunohistoquímica que se realizó usando los anticuerpos primarios anti- MHC CII, anti-Thy-1 y anti-CD11b(Mac-1).

Anticuerpo monoclonal de rata anti-CD11b de ratón (Mac-1) Biotinado, Pharmingen. No. de Catalogo 01712A. Este anticuerpo es producido por la clona M1/70 y su isotipo corresponde a IgG_{2b}, κ. Se une específicamente a la subunidad de 170-kDa de CD11b (Mac-1), también conocido como el receptor de complemento 3 (CR3), el cual media la adhesión a C3bi e ICAM-1 (CD54). Este se usó a una dilución 1:100.

Debido a que en la literatura se describe el marcador MHC CII como el más usado para la localización de DC, se decidió hacer la caracterización inmunohistoquímica en todas las secciones intestinales (duodeno, yeyuno, ileon e intestino grueso) mientras que para los anticuerpos Thy-1 y CD11b (Mac-1), solo se dividieron las secciones en intestino delgado y grueso.

El anticuerpo primario se incubó durante la noche a 4°C y al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno, con albúmina sérica de bovino (BSA, del inglés Bovine seric albumin) 0.1% en solución salina (Fig. 7). En caso de que el primer anticuerpo no estuviera biotinado, se colocó el segundo anticuerpo anti-rata biotinado, el cual se incubó durante 1hr a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno, por último el tejido se incubó con la estreptavidina peroxidasa (SAVPOX) por 1hr a temperatura ambiente (Fig. 7). La reacción se reveló con diaminobencidina (DAB), durante 10 o 15min, la cual desarrolla un color marrón característico (Fig. 8).

Anticuerpo policlonal de conejo anti-rata, Biotinado, Vector Laboratories. No. de Catalogo BA-4001. Usado como segundo anticuerpo para detectar aquellos anticuerpos primarios de rata que no están biotinados. Reconstituido su composición final es 10mM de fosfato, pH 7.8, 0.15M de NaCl, 0.08% de azida de sodio y 0.5mg de IgG biotina activa. Este se usó a una dilución de 1:350.

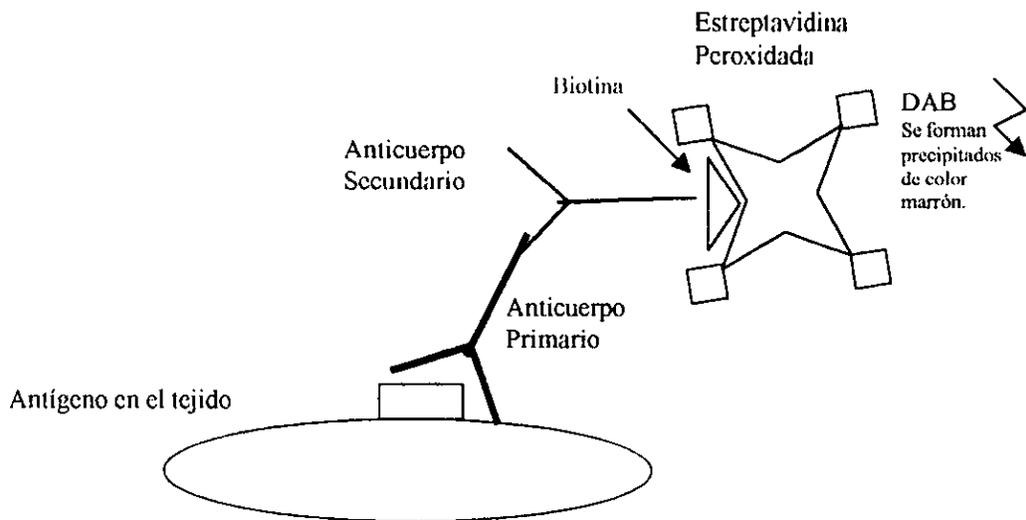


Figura 8. Diagrama que ilustra las interacciones entre los componentes del sistema usados en la inmunohistoquímica. La peroxidasa (□) se encuentra unida covalentemente a la estreptavidina (✕). El anticuerpo primario se une directamente al antígeno a identificar y a este se une el segundo anticuerpo con la biotina acoplada (Δ). La interacción entre la peroxidasa y la DAB produce precipitados de color marrón, lo cual evidencia la reacción.

Estreptavidina conjugada con Peroxidasa (SAVPOX) SBA. No. de Catalogo 7100-05. Proteína tetramérica purificada de *Streptomyces avidinii*, compuesta por cuatro subunidades idénticas cada una con un sitio de alta afinidad para biotina. Acoplada a peroxidasa. La dilución a la que se usó es 1:500.

Cinética

Según el proceso ya descrito, se obtuvieron las láminas intestinales de ratones Balb/c de 3, 6 y 8 semanas de edad y se realizaron inmunohistoquímicas de todas las secciones intestinales en cada caso, usando el anticuerpo anti-MHC CII siguiendo el procedimiento ya descrito.

Montaje

Las muestras en las que se realizó la inmunohistoquímica se montaron con la resina Poli-mount (Polysciences, No. de Catalogo 08381). Estas se montaron en portaobjetos previamente desengrasados y se les colocó un cubreobjetos, sobre el cual se ejerció presión para que la muestra quedara con el menor número de pliegues, posteriormente se introdujo la laminilla en hielo seco hasta que se congeló, para después retirar el cubreobjetos con una navaja y someter la muestra a una deshidratación rápida con alcohol etílico absoluto, las muestras se dejaron secar y se les colocó la resina y un cubreobjetos nuevo.

Conteo

Para cada experimento se realizaron un mínimo de 2 repeticiones, de cada repetición se obtuvieron las muestras correspondientes contando con 2 ratones por cada variable o condición, en cada muestra se contabilizaron el número de células por lo menos en 10 campos, en un aumento de 400x.

Con el número obtenido de células por campo, se calculó la densidad celular por área por medio de la siguiente relación; considerando la cifra de campo visual y el aumento se calculó el diámetro de campo, que para el microscopio (American Optics) que se usó, según la siguiente fórmula:

Φ de Campo = Cifra de Campo Visual/Aumento del Objetivo (Rincón Sánchez and Reyes Ortíz 1992)

$$\Phi \text{ de Campo} = 18\text{mm}/40\text{x}$$

$$\Phi \text{ de Campo} = 0.45\text{mm} = 450\mu$$

Calculando así el diámetro de campo, se obtuvo el área por campo según la siguiente fórmula:

$$\text{Área de Campo} = \pi r^2$$

$$\text{Área de Campo} = (3.1416) (225\mu)^2$$

$$\text{Área de Campo} = 0.1590 \mu^2$$

Considerando así el área en la cual se cuentan las células, con una regla de tres se calculó el número de células en cualquier área. En este caso se calculó por milímetro cuadrado.

Cortes Semifinos de las Láminas Obtenidas

Las láminas intestinales de ratones Balb/c adultos y una muestra de explante de intestino completo se fijaron en glutaraldehído al 2.5% durante 1 hr, después de extraídas y lavadas con solución salina al 0.85%. Concluido el tiempo de fijación, las muestras se lavaron abundantemente con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, y fueron procesadas con la técnica convencional de microscopía electrónica, la cual se describe a continuación.

Después de lavar, las muestras se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% en cacodilato de sodio 0.1M durante 1hr. Posteriormente las muestras se lavaron con cacodilato de sodio durante 10min y se deshidrataron gradualmente con alcoholes (70%, 90% y 100%) realizando dos cambios de 10min cada uno. Una vez deshidratadas las muestras se trataron con óxido de propileno durante 10min, para posteriormente preincluir las muestras en una mezcla de epon y óxido de propileno 1:1 durante 12hrs. Terminado el tiempo de preinclusión, se retiró la resina de preinclusión y se incluyeron las muestras en epon para polimerizarlas durante 24 hrs a 60°C.

Los bloques polimerizados se cortaron en un ultramicrotomo Reichert-Jung para la obtención de cortes semifinos usando cuchilla de vidrio, con un grosor de 0.9 μ . Estos cortes se tiñieron con azul de toluidina para su observación en microscopía óptica.

Análisis Estadístico

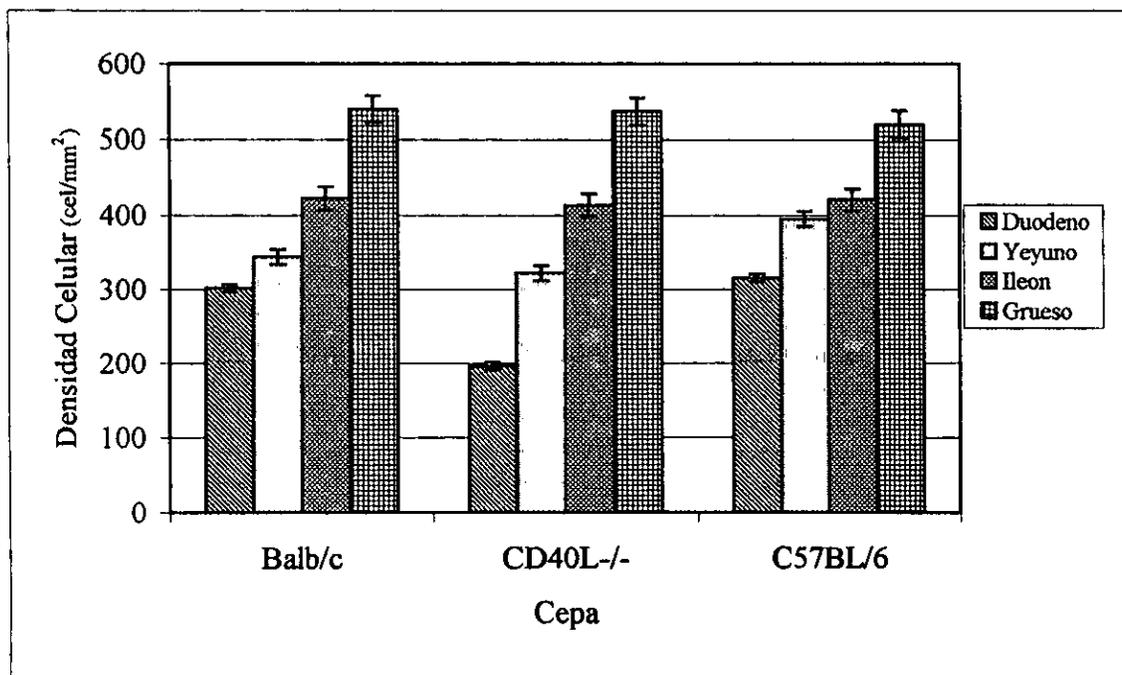
El análisis de todos los resultados se realizó con el programa SPSS para Windows Ver. 10.1. En el caso de la caracterización con los marcadores MHC CII, Thy-1 y CD11c (Mac-1) en las diferentes cepas murinas y la cinética de expresión de MHC CII en ratones Balb/c se aplicó una ANOVA de una cola para determinar si existe diferencia significativa entre los grupos. Para el caso de comparar los valores con los marcadores CD11c (Mac-1) y Thy-1 de intestino delgado y grueso de un mismo ratón se aplicó una prueba de t.

Resultados

Caracterización Inmunohistoquímica de Láminas Intestinales de ratones Balb/c, C57BL/6 y CD40L^{-/-}

Por inmunohistoquímica se encontró que solo la lámina interna mostraba células positivas para los marcadores usados, mientras que la lámina externa fue negativa (Fig. 9).

El anticuerpo anti-MHC CII identificó una población celular uniforme con morfología claramente dendrítica (Fig. 10). La densidad de dicha población incrementa a lo largo del intestino, iniciando en duodeno en un intervalo entre 196-315 cel/mm² alcanzando niveles en el intestino grueso en un intervalo entre 520-540 cel/mm². La distribución ascendente en la densidad a lo largo del intestino es la misma en las tres cepas de ratones, sin embargo los valores mínimos de densidad en el intestino delgado los presenta la cepa mutante CD40L^{-/-} (Grafica 1).



Gráfica 1. Distribución de la densidad de células dendríticas MHC CII⁺ en el intestino de ratones adultos Balb/c, CD40L^{-/-} y C57BL/6.

Existe una diferencia significativa entre los valores de duodeno, yeyuno, íleon e intestino grueso en los casos de los tres tipos de ratones (Balb/c, $F = 30.45$ $P > 0.001$, C57BL/6, $F = 36.661$

$P > 0.001$ y $CD40L^{-/-}$, $F = 58.83$ $P > 0.001$), sin embargo no existe diferencia significativa comparando las secciones anatómicas entre las cepas ($F = 2.54$, Valor de Tablas $F = 3.975$).

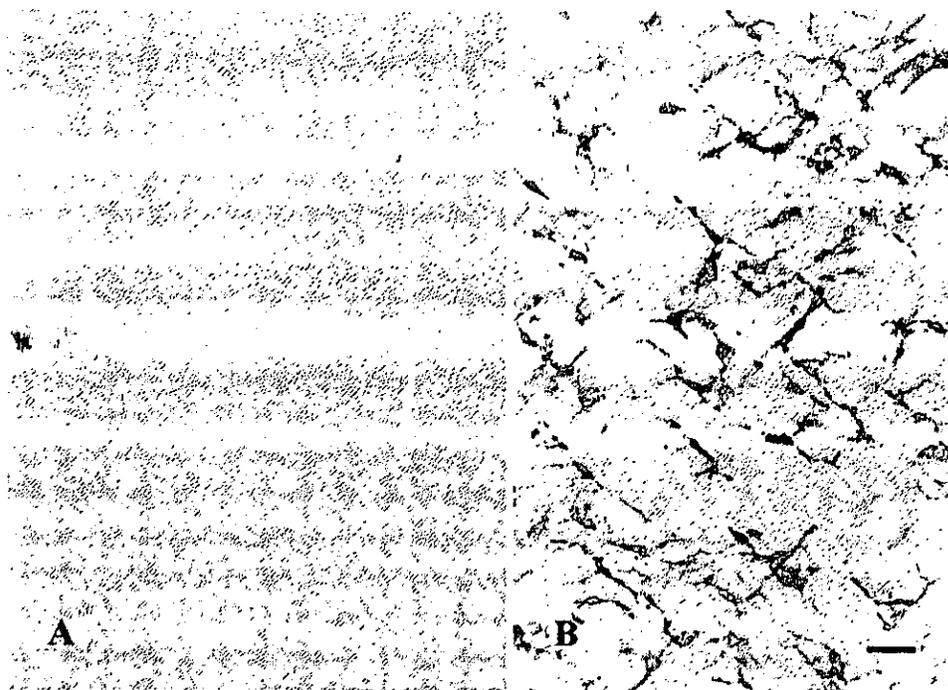


Figura 9. Inmunohistoquímica con MHC CII en la sección externa (A) e interna (B) obtenidas después de tratamiento con EDTA. (32x). Barra=30 μ .

Usando el anticuerpo Thy-1 en la sección interna se encontraron dos poblaciones positivas; la primera con morfología dendrítica y la segunda con morfología no dendrítica, en todas las cepas. Estas poblaciones son menos uniformes que la $MHC\ CII^+$ (Fig. 11). En el caso de las células con morfología dendrítica la densidad aumenta a partir del intestino delgado, presentado valores dentro del intervalo de 157-308 cel/mm² hasta alcanzar valores en el intervalo de 190-479 cel/mm² en el intestino grueso. En el caso del ratón $CD40L^{-/-}$ la relación es a la inversa, se observa mayor densidad en el intestino delgado (303cel/mm²) que en el intestino grueso (204cel/mm²) (Grafica 2).

La población $Thy-1^+$ con morfología no dendrítica presenta un densidad menor a la encontrada con morfología dendrítica y su densidad disminuye a partir del intestino delgado, donde se presentan valores en el intervalo entre 58-300cel/mm², hacia el intestino grueso donde existe una densidad en el intervalo entre 23-260cel/mm² (Grafica 3).

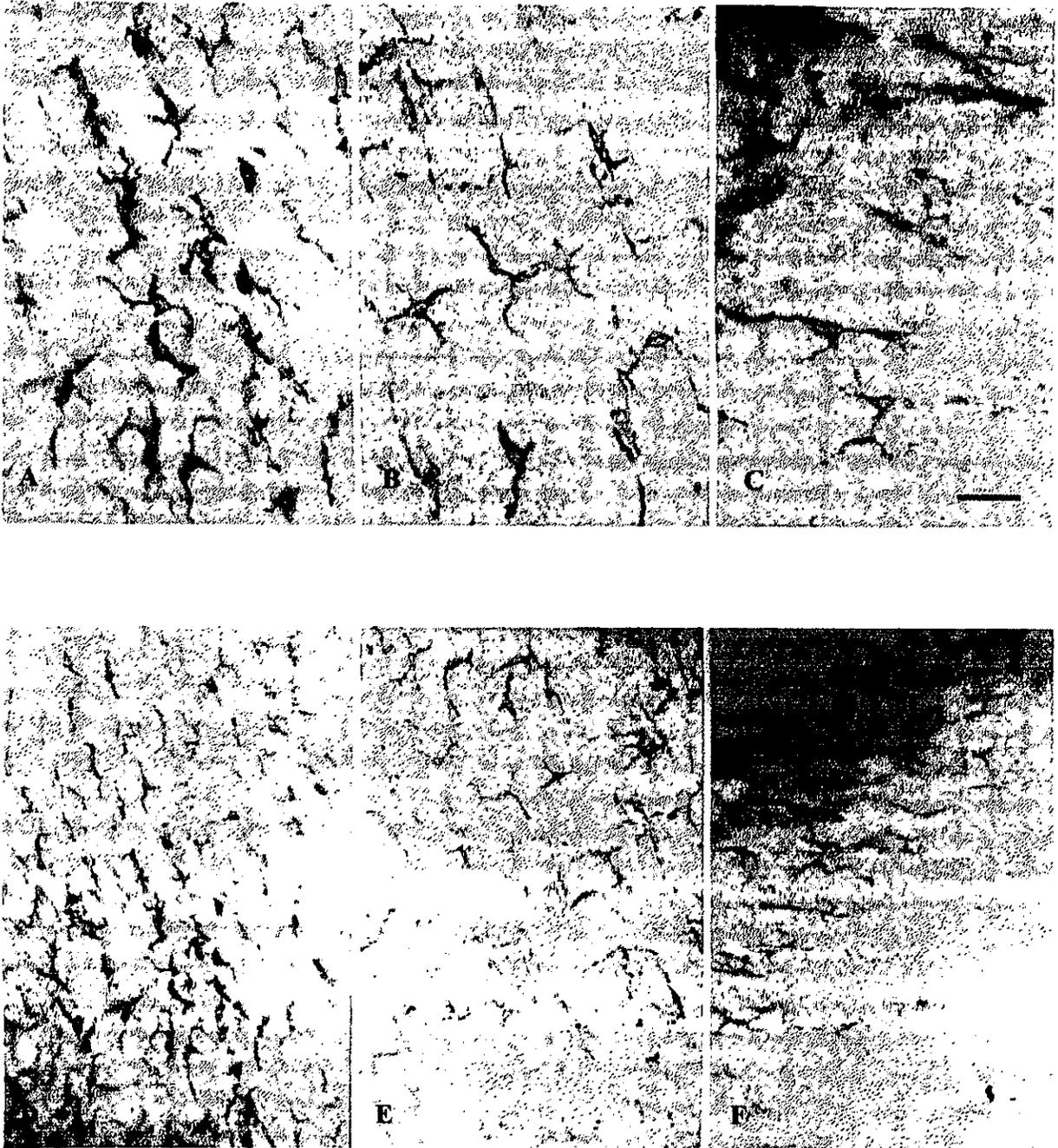
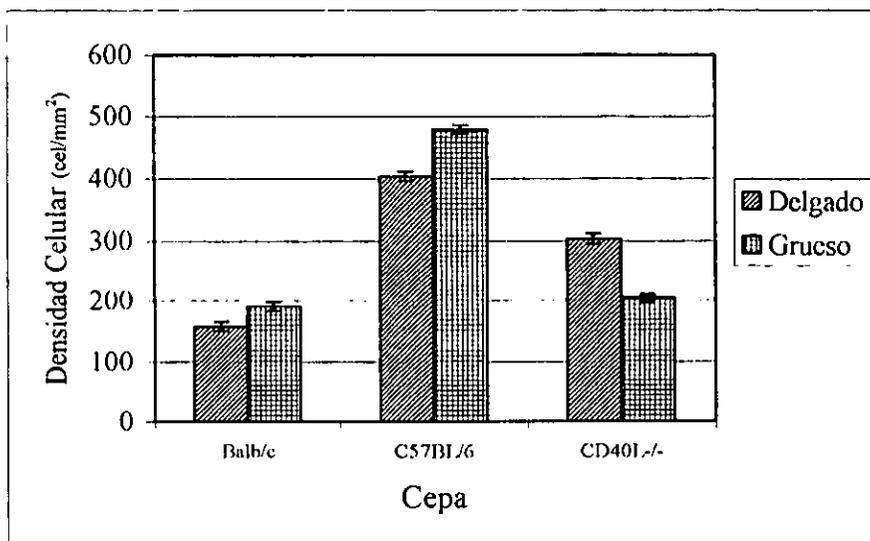
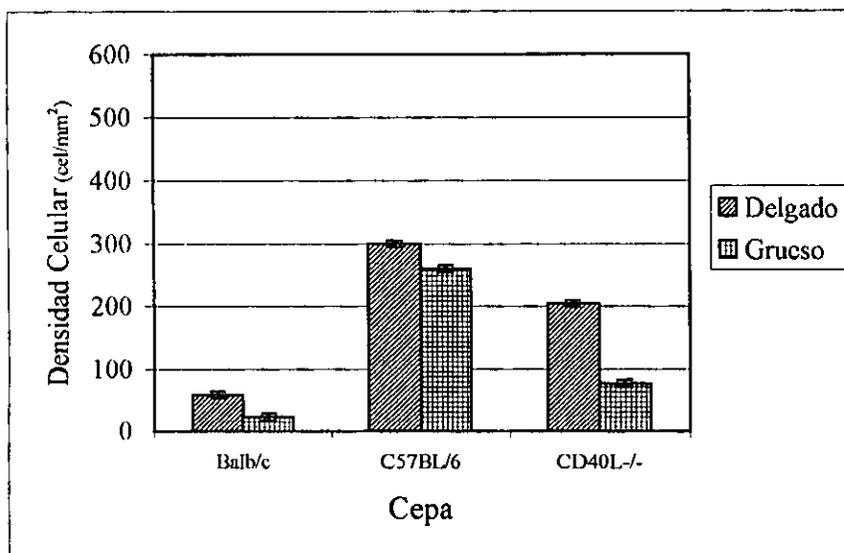


Figura 10. Inmunohistoquímica con MHC CII en la lámina intestinal interna de 3 cepas de ratones. (A) Balb/c, (B) C57BL/6, (C) CD40L^{-/-}. (64x). (D) Balb/c, (E) C57BL/6, (F) CD40L^{-/-}. (32x). Barra = 30 μ .



Grafica 2. Densidad de células Thy-1⁺ con morfología dendrítica en intestino de ratones Balb/c, C57BL/6 y CD40L-/-.



Grafica 3. Densidad de células Thy-1⁺ con morfología no dendrítica en intestino de ratones Balb/c, C57BL/6 y CD40L-/-.

Usando el anticuerpo CD11b (Mac-1) se encontró también una población uniforme con morfología dendrítica (Fig. 12). La densidad de esta población aumenta del intestino delgado al intestino grueso, encontrando valores en el ID en el intervalo de entre 232-416cel/mm² con valores en el intervalo de 368-555cel/mm² en el IG (Grafica 4). La distribución ascendente de la densidad celular a lo largo del intestino se mantiene en las tres cepas de ratones usados. Existe una diferencia significativa entre los valores de intestino delgado y grueso entre las cepas ($F = 105.9, P > 0.001$; $F = 56.82, P > 0.001$)

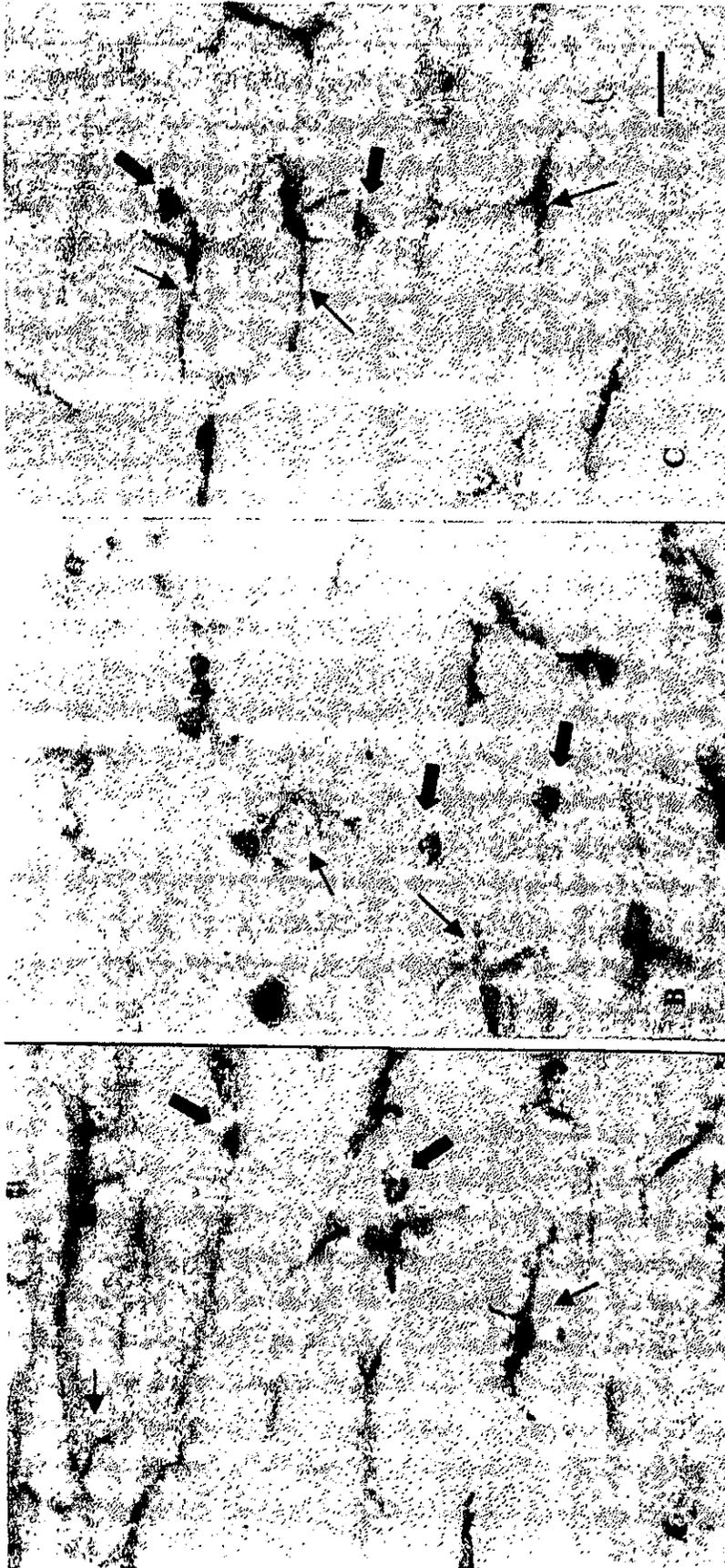
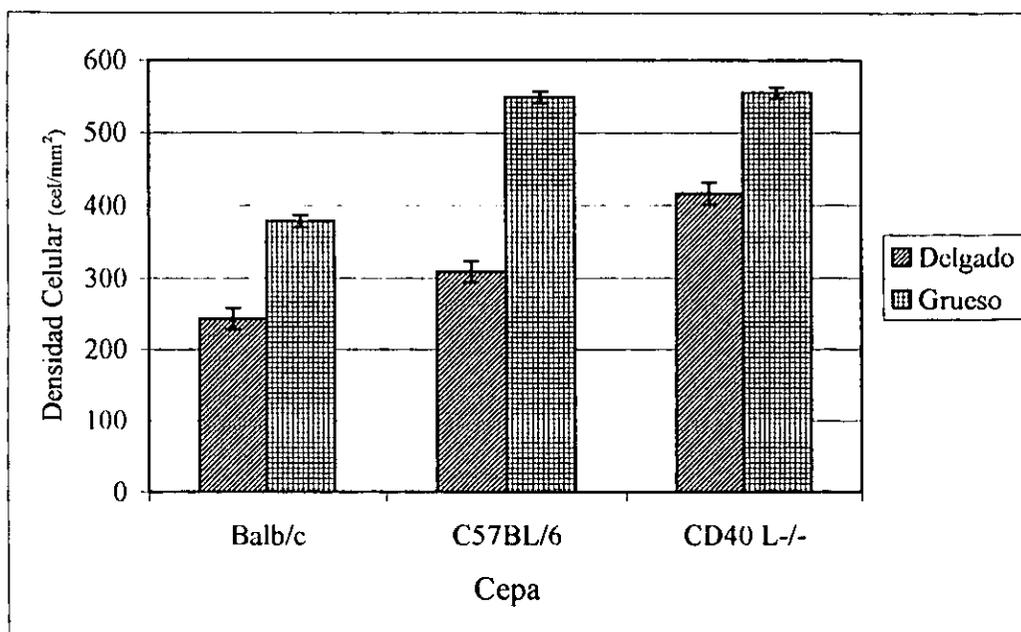


Figura 11. Inmunohistoquímica con Thy-1 en la lámina intestinal interna de 3 cepas de ratones. (A) Balb/c, (B) C57BL/6, (C) CD40L-/. (64x). Las células dendríticas están señaladas con flechas delgadas y las no dendríticas con flechas gruesas. Barra = 30 μ .



Grafica 4. Densidad de células CD11b (Mac-1)⁺ con morfoloía dendrítica en intestino de ratones adultos Balb/c, C57BL/6 y CD40L-/-.

Cinética de Expresión de MHC CII en ratones Balb/c

En la cinética de expresión de MHC CII se observaron algunas variaciones en las densidades celulares. El aumento en densidad celular según la sección anatómica también se volvió a observar. En el caso del intestino delgado no se dieron cambios dramáticos en la densidad a lo largo del tiempo estudiado, sin embargo en el caso del intestino grueso se observó una disminución en la densidad a la semana 6, presentando valores de 313cel/mm², con respecto a los valores observados en la semana 3 (461cel/mm²). La densidad se recuperó a los niveles normales del adulto en la semana 8, presentando valores de 540cel/mm² (Grafica 5). No se encontró diferencia significativa entre los valores de intestino delgado a las diferentes edades, sin embargo sí existe diferencia significativa cuando se compara con los valores del intestino grueso ($F=46.40$, $P>0.001$).

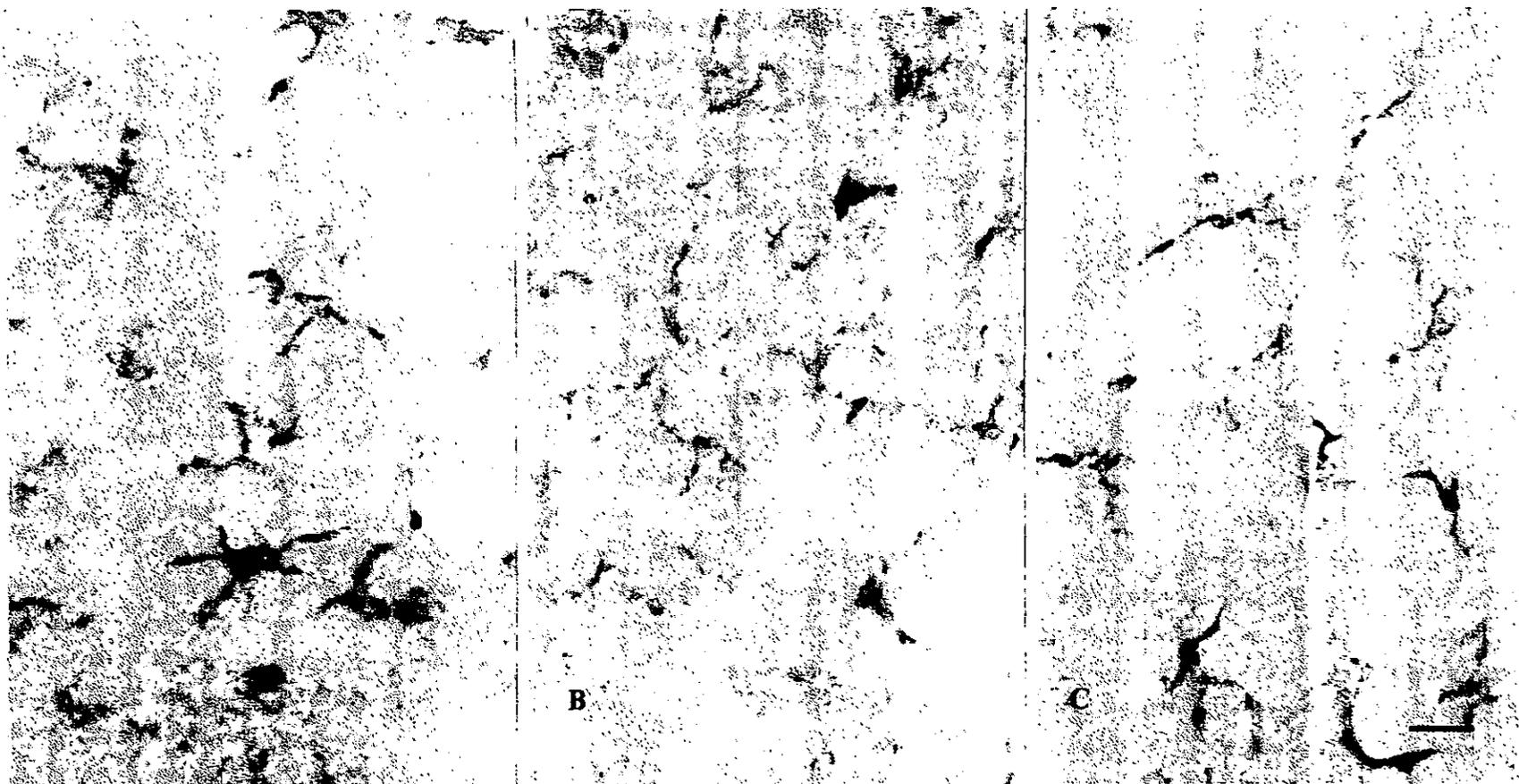
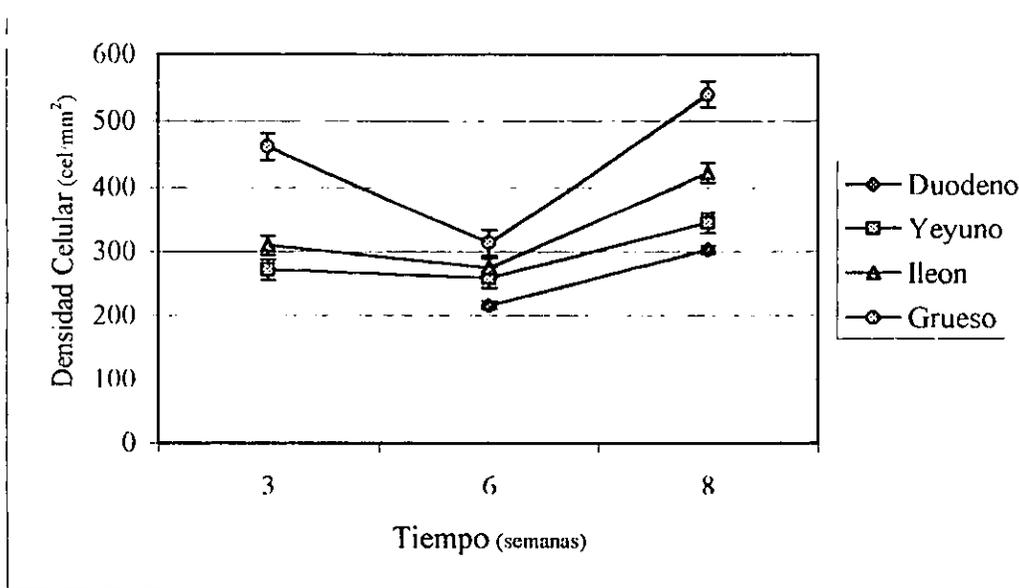


Figura 12. Inmunohistoquímica con CD11b (Mac-1) en la lámina intestinal interna de 3 cepas de ratones. (A) Balb/c, (B) C57BL/6, (C) CD40L^{-/-}. (64x). Barra=30μ.



Grafica 5. Densidad de células dendríticas MHC II⁺ de la lámina intestinal interna de ratones Balb/c de diferentes edades en cuatro regiones anatómicas.

Localización Histológica de las poblaciones celulares descritas por Inmunohistoquímica

Al realizar cortes transversales del intestino normal (Fig. 14a) y de las láminas interna (Fig. 14c) y externa (Fig. 14b) obtenidas después del tratamiento con EDTA, con el explante de intestino completo se observó toda su estructura histológica: el epitelio (E) cilíndrico simple, debajo del cual está la lámina propia (LP) penetrando en las vellosidades, por debajo de ésta, la lámina submucosa (S) donde se puede observar las criptas de Lieberkühn (Fig. 13 y 14a). En la sección mas interna se puede observar las dos láminas musculares (M), una que corre longitudinalmente y la otra de forma circular (Fig. 14c), hecho que se evidencia en el corte (Fig. 14).

En los cortes de la sección externa después del tratamiento con EDTA, se pierde el epitelio (E) y se mantiene la LP y la submucosa (S), incluso se observan algunas criptas de Lieberkühn (Fig. 14b). La estructura de la LP penetrando en las vellosidades también se mantiene (Fig. 14b). El grosor aproximado de esta lámina es de 170 μ .



Figura 13. Cortes transversales de intestino delgado normal de ratón Balb/c (A) Intestino completo (20x), (B) Vellosidad intestinal (64x). Tinción hematoxilina-eosina. E= Epitelio, LP= Lámina propia, S= Submucosa y M= Muscular. Barra=30 μ .

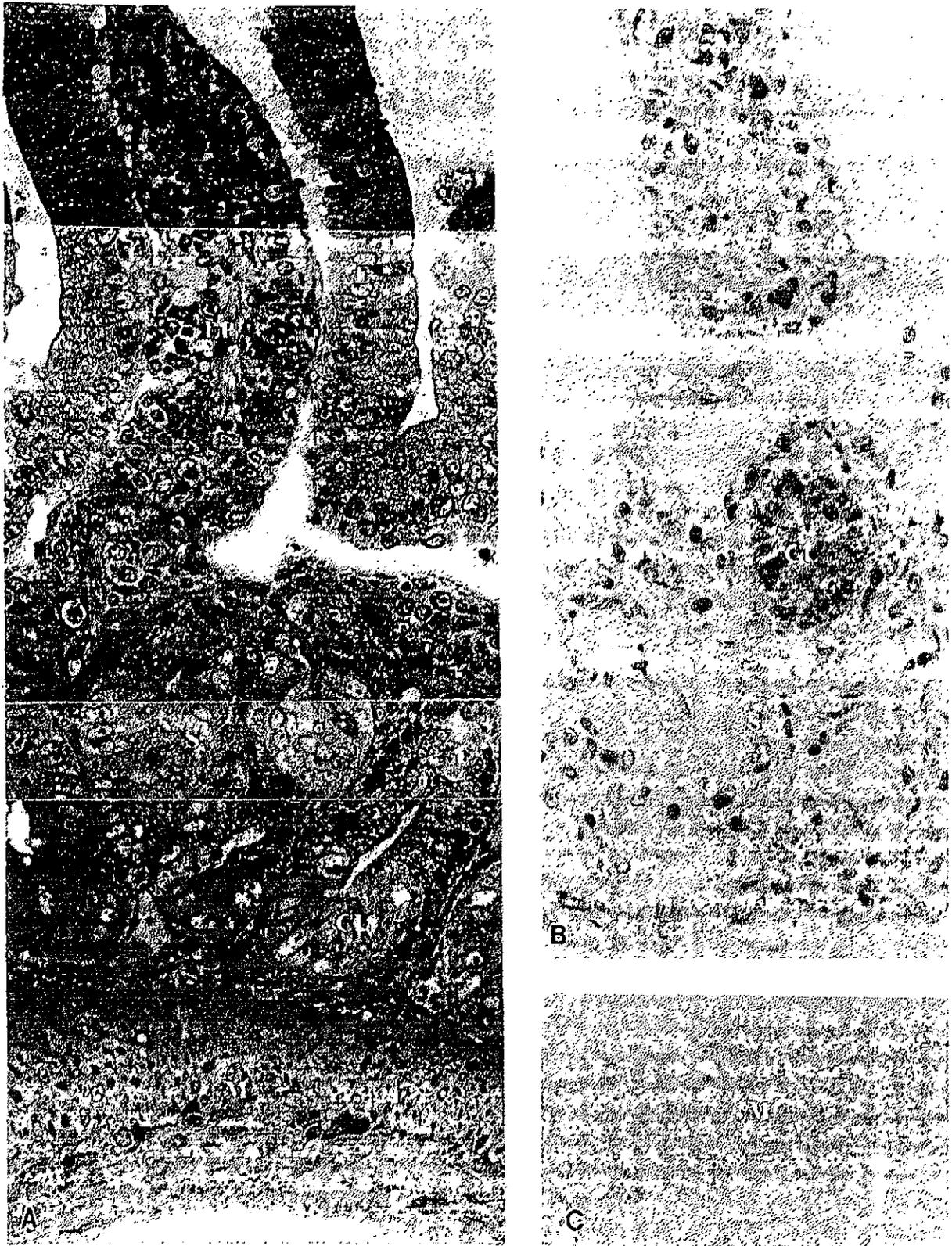


Figura 14. Cortes semifinos transversales de intestino delgado normal de ratón Balb/c (A), lámina externa (B) e interna (C) después de EDTA. E= Epitelio, LP= Lámina propia, S= Submucosa y M= Muscular, CR= Cripta de Lieberkühn. Teñidos con azul de toluidina. (64x). Barra=30 μ .

Con respecto a la lámina interna esta tiene un grosor de aproximadamente 50μ y presenta células con citoplasma retraído, estas células son muy homogéneas, hacia la base se encuentran células mucho más alargadas con un citoplasma muy vacuolado. La lámina serosa se pierde por completo (Fig. 14c).

Discusión

Desde que las DC fueron descritas como células accesorias en bazo hace 28 años (Steinman and Cohn 1973) se han estudiado y caracterizado ampliamente. Actualmente se sabe que estas células actúan como centinelas en muchos tejidos no linfoides donde su principal función es la de captar antígenos, procesarlos, transportarlos y presentarlos a los linfocitos T en el tejido linfoide más próximo (Banchereau and Steinman 1998). La subpoblación más estudiada es la de las células de Langerhans, las cuales han sido analizadas tanto *in vivo* como *in vitro* (Steinman 1991).

En el caso de las DC intestinales su caracterización aún esta en proceso, diversos estudios han demostrado en la lámina propia la presencia de “células positivas” para el marcador MHC CII⁺, sin embargo no son resultados concluyentes (Mayrhofer, Pugh et al. 1983; Soesatyo, Biewenga et al. 1990; Maric, Holt et al. 1996). Las principales evidencias de la existencia de las DC intestinales derivan de estudios *in vitro*, donde las células son colectadas de vasos linfáticos que van a los ganglios mesentéricos (Pavli, Hume et al. 1993; Liu and Macpherson 1995; Liu and Macpherson 1995). Los únicos trabajos *in vivo* que demuestran la presencia de DC *in situ* en el intestino, son en cortes transversales realizados en la lámina propia.

En el presente trabajo se demostró la presencia de una población de células con morfología claramente dendrítica MHC CII⁺ en la lámina intestinal interna, la cual no ha sido descrita anteriormente (Steinman 2000, Comunicación personal). Es posible que su ubicación en la lámina intestinal interna esté relacionada a la cercanía con los vasos linfáticos que conforman el plexo linfático localizado por debajo de la submucosa, el cual consiste de los vasos que vienen de la mucosa y los de la lámina muscular (Geneser 1984; Gartner and Hiatt 1997). Esta observación podría ser importante por que indica el acceso que estas células tendrían tanto a las vías linfáticas para desplazarse hacia los ganglios mesentéricos, como a los diversos antígenos presentes en estos vasos. Existen trabajos que demuestran la capacidad de las DC intestinales para captar cuerpos apoptóticos (Albert, Pearce et al. 1998; Albert, Sauter et al. 1998). Un trabajo reciente en rata demuestra que DC intestinales colectadas de vasos linfáticos portan cuerpos apoptóticos de células epiteliales de intestino (Huang, Platt et al. 2000), y se ha propuesto que su papel estaría relacionado con inducción de tolerancia hacia antígenos tisulares propios (Steinman, Turley et al. 2000).

La ausencia de células con morfología dendrítica y con marcadores MHC CII en la lámina intestinal externa, bien podría deberse a una limitación técnica (que la lámina sea demasiado gruesa y

no permita la apreciación de células positivas en microscopía óptica), dado que el grosor de esta lámina es de aproximadamente 170 μ , o bien a que las células no están expresando este marcador cuando se localizan en esta zona, o bien a que efectivamente, en esta área no hay este tipo de células.

La densidad celular diferente en las varias secciones anatómicas del intestino quizá pudiera relacionarse con las funciones y condiciones fisiológicas intestinales. Así en el intestino delgado donde la principal función es la absorción, y los niveles de organismos patógenos y comensales son bajos ya que las condiciones bioquímicas y el alto peristaltismo no permiten el establecimiento de muchos organismos, es donde existe el menor número de estas células. En cambio, en el intestino grueso donde los niveles de organismos patógenos superan por mucho los encontrados en el intestino delgado, se observaron los niveles mas altos de células dendríticas MHC CII⁺.

Las células CD11b(Mac-1)⁺ dendríticas corresponden a otra población aún no descrita en el intestino. En la literatura se ha descrito la ausencia de células CD11b(Mac-1)⁺ macrofágicas en el intestino tanto de ratón (Kelsall and Strober 1996) como de humano (Pavli, Maxwell et al. 1996). Considerando la morfología de las células que observadas en las inmunohistoquímicas, éstas podrían corresponder a DC, aunque habría que probar su funcionalidad. Se ha demostrado la expresión de moléculas CD11b (Mac-1) en células dendríticas de bazo (Lecnen, Radosevic et al. 1998) y de Langerhans. Estos trabajos postulan que la expresión de esta molécula esté relacionada con el linaje al cual corresponden; en este caso se propone que sean de linaje mielóide (Anjuere, Martín et al. 1999). Se ha demostrado en granulocitos que la expresión de este marcador está relacionada con quimiotaxis y adhesión (Anderson, Miller et al. 1986), además de que juega un papel importante en la fagocitosis de bacterias mediada por complemento (este marcador es también un receptor de complemento). La expresión de esta molécula en DC no se modifica con la maduración, a diferencia de monocitos y neutrófilos, los cuales regulan la expresión de CD11b (Mac-1) durante su diferenciación y ante la presencia de estímulos inflamatorios (Rescigno, Rittig et al. 1999).

Las células Thy-1⁺/ $\gamma\delta$ ⁺ dendríticas son una población particular de piel (DETC), y su funcionalidad es aún incierta (Bergtresser, Robert et al. 1983). Estas células también se han descrito en el carrillo bucal y esófago, y se propone que están relacionadas sólo con epitelios estratificados (Cohen, Alves et al. 1987). Sin embargo, se encontró una población Thy-1⁺ con morfología claramente dendrítica *in situ* en intestino, el cual cuenta con un epitelio monoestratificado (simple) y la ubicación de esta población es en la lámina intestinal interna (entre la submucosa y la muscular). Esta población tampoco se ha descrito hasta la fecha. La población Thy-1⁺ no dendrítica corresponde a una población

de linfocitos T intestinales que aparentemente no ha sido descrita en la lámina intestinal interna. Sólo se ha descrito una población de linfocitos T $\text{Thy-1}^+/\gamma\delta^+$ intraepiteliales en la lámina propia (Liu and Macpherson 1995).

En cuanto a la edad de los ratones Balb/c, el resultado que cabe destacar es la disminución en la densidad de células MHC CII^+ en la semana 6 y el aumento en la semana 8. El intestino de los ratones cuenta con ciertas características fisiológicas y bioquímicas cuando nacen, las cuales se modifican a lo largo de su vida, tal vez los cambios más dramáticos se dan en el momento del destete (fecha en que las crías se separan de la madre y deben de alimentarse por sí mismas). Es precisamente en este momento cuando se dan los mayores niveles de estimulación antigénica, el intestino sufre cambios dramáticos que van desde el aumento en el grosor de la pared intestinal, el aumento en la actividad de fosfatasa alcalina, hasta el incremento en las poblaciones de microorganismos comensales (Kaplan, Brewer et al. 1983). Es posible que la variación observada en la densidad de células dendríticas MHC CII^+ esté relacionada con estos cambios.

El ligando de CD40 es una glicoproteína de 33kDa (261 residuos de aminoácidos) que se expresa en linfocitos T CD4 activados, linfocitos T CD8, basófilos y eosinófilos (Banchereau, Bazan et al. 1994). Pertenece a la superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), las moléculas pertenecientes a esta familia realizan funciones biológicas que incluyen la proliferación, la inducción de secreción de citocinas y la apoptosis (Maliszewski, Kennedy et al. 1998). Su receptor, CD40 es una glicoproteína de 50kDa (277 residuos de aminoácidos) expresada en células B, monocitos, DC, DC foliculares, epitelio tímico y en algunos carcinomas (Banchereau, Bazan et al. 1994). La interacción de estas moléculas tiene diversas consecuencias, y en el caso de las DC se ha demostrado *in vivo* que la ausencia del ligando de CD40 interfiere con la migración de las células de Langerhans desde la periferia a los ganglios linfáticos, después de estimulación antigénica tópica (Moodycliffe, Shreedhar et al. 2000).

Respecto a los datos obtenidos en los ratones $\text{CD40L}^{-/-}$, se ha descrito que en el caso de las células de Langerhans no existe diferencia en densidad celular ni en morfología entre esta cepa y los C57BL/6 (Moodycliffe, Shreedhar et al. 2000). En nuestros estudios en intestino tampoco se encontró diferencia, por lo que se concluyó que la ausencia de CD40L no parece ser fundamental para el desarrollo ontogénico de DC ni para la colonización de esta población de DC en intestino.

Conclusiones

Se obtuvieron dos láminas intestinales, aplicando la técnica de separación de láminas epidérmicas en el intestino. La lámina externa (hacia el lumen) consta de la LP y la submucosa, mientras que la lámina interna (hacia la serosa) consta de las dos secciones de músculo presentes en el intestino.

Se encontraron células con morfología claramente dendrítica positivas para los marcadores MHC CII, CD11b (Mac-1) y Thy-1 solamente en las secciones intestinales internas, cuyas densidades aumentan a lo largo de las regiones anatómicas intestinales. La presencia y densidad de estas células no varía entre las cepas de ratones con las que se trabajó (Balb/c, C57BL/6 y CD40L^{-/-}).

En el caso de las células Thy-1⁺ se encontraron, además de una población claramente dendrítica, otra con morfología no dendrítica en la sección intestinal interna, cuya densidad es mayor en el intestino delgado que en el grueso.

Perspectivas

- ❖ Realizar dobles marcajes para determinar el porcentaje de células dobles positivas MHC CII/CD11b (Mac-1)
- ❖ Para determinar si la población dendrítica MHC CII⁺ está asociada a vasos linfáticos, realizar doble marcaje con CD31 y MHC CII.
- ❖ Usar el modelo de explantes intestinales para analizar la capacidad de migración *in vitro*, empleando diferentes tiempos de cultivo y quimiocinas.
- ❖ Realizar un análisis funcional para la captación de antígenos administrados oralmente (partículas de carbón, partículas de látex marcadas o *E. coli* marcadas), para posteriormente realizar inmunohistoquímica, microscopía confocal y MET.
- ❖ Dado que muchos antígenos no penetran fácilmente hasta la sección histológica donde se describen las células, se propone estudiar la captación de antígenos induciendo la formación de úlceras focales mediante la administración de indometacina.
- ❖ Examinar si estas células portan cuerpos apoptóticos, dado que ello se reportó para otras poblaciones de DC en intestino de rata (Huang, Platt et al. 2000).

Referencias

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (1997). Cellular and molecular immunology, W.B. Saunders.
- Aguilar Morales, M., B. Coutiño Bello, et al. (1996). Manual general de técnicas histológicas y citoquímicas. México, D.F., Facultad de Ciencias, UNAM.
- Albert, M. L., S. F. A. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\beta$, and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." Journal of Experimental Medicine 188: 1359-1368.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." Nature 392: 86-89.
- Alberts, B. (1991). Molecular biology of the cell. New York, Omega.
- Anderson, D. C., L. J. Miller, et al. (1986). "Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies." Journal of Immunology 137: 15-27.
- Anjuere, F., P. Martín, et al. (1999). "Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse." Blood 93(2): 590-598.
- Banchereau, J., F. Bazan, et al. (1994). "The CD40 antigen and its ligand." Annual Review in Immunology 12: 881-922.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature 392: 245-252.
- Berber, E. A. (1992). Manejo y presentación de antígenos en el sistema inmunitario asociado a mucosa intestinal. Inmunología de las mucosas. A. G. Acosta and L. M. Cruz, Atelier Producciones.
- Bergtresser, P. R., M. D. Robert, et al. (1983). "Thy-1 antigen-bearing dendritic cells populate murine epidermis." Journal of Investigative Dermatology 81: 286-288.
- Berk, E. J. (1987). Gastroenterología, Salvat Editores.
- Born, W., M. P. Happ, et al. (1990). "Recognition of heat shock proteins and $\gamma\delta$ cell function." Immunology Today 11(2): 40-44.
- Brown, J. F. and E. Balish (1978). "Gastrointestinal microecology of Balb/c Nude Mouse." Applied and Environmental Microbiology 36(1): 144-159.
- Cella, M., F. Sallusto, et al. (1997). "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." Current Opinion in Immunology 9: 10-16.
- Cohen, R. L., A. F. Alves, et al. (1987). "Topographic distribution of Thy-1 positive cells in epithelial tissues of balb/c mice." Archives in Oral Biology 32(1): 11-15.

- Cook, M. J. (1983). Anatomy. The mouse in biomedical research. A. C. o. L. A. Medicine. United Kingdom, Academic Press. III.
- Cumberbatch, M. and I. Kimber (1990). "Phenotypic characteristics of antigen-bearing cells in the draining lymph nodes of contact sensitized mice." Immunology 71(3): 404-410.
- Davis, C. P. and D. C. Savage (1974). "Habitat, succession, attachment, and morphology of segmented, filamentous microbes indigenous to the murine gastrointestinal tract." Infection and Immunity 10(4): 948-956.
- Dubey, C., M. Croft, et al. (1995). "Costimulatory requirements of naive CD4⁺ T cells." Journal of Immunology 155: 45-57.
- Dubos, R., W. Russell, et al. (1965). "Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract." Journal of Experimental Medicine 122: 67-77.
- Elwood, C. M., A. S. Hamblin, et al. (1997). "Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subsets and MHC CII expression in the canine small intestine." Veterinary Immunology and Immunopathology 58: 195-207.
- Fan, H., Q. Lin, et al. (1999). "Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin." Nature Biotechnology 17: 870-872.
- Foster, H. L., J. D. Small, et al. (1983). The Mouse in Biomedical Research. United Kingdom, Academic Press.
- Fujiashi, D. S., T. Kawabata, et al. (1996). "γ/δ T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses." Journal of Experimental Medicine.
- Gartner, L. P. and J. L. Hiatt (1997). Histología Texto y Atlas. México, D.F., Mc Graw Hill.
- Geneser, F. (1984). Histología. Buenos Aires, Editorial Medica Panamericana.
- Grabbe, S., E. Kämpgen, et al. (2000). "Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional." Immunology Today 21(9): 431-33.
- Groh, V., A. Steinle, et al. (1998). "Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial γδ T cells." Science 279: 1737-1740.
- Grouard-Vogel, G., M.-C. Risoan, et al. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand." Journal of Experimental Medicine 185(6).
- Heras, M. (2001). Estudio fenotípico y funcional de las células de Langerhans en ratones neonatos. Departamento de Inmunología. México, D.F., ENCB.
- Hershberg, R. M. and L. F. Mayer (2000). "Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity." Immunology Today 21(3): 123-128.

- Huang, F. P., N. Platt, et al. (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." Journal of Experimental Medicine **191**(3): 435-443.
- Iwasaki, A. and K. B.L. (1999). "Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses." American Journal of Physiology **276**(39): G1074-G1078.
- Kagnoff, M. F. (1998). "Current concepts in mucosal immunity. III. Ontogeny and function of $\gamma\delta$ T cells in the intestine." Journal of Physiology **274**: G455-G458.
- Kagnoff, M. F. and H. Kiyono (1996). Essentials of Mucosal Immunology. San Diego, EUA., Academic Press.
- Kaplan, H. M., N. R. Brewer, et al. (1983). Physiology. The mouse in biomedical research. H. L. Foster, J. D. Small and J. G. Fox. UK, Academic Press. **III**.
- Kelsall, B. L. and W. Strober (1996). "Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's Patch." Journal of Experimental Medicine **183**: 237-247.
- Konecny, P., A. J. Stagg, et al. (1999). "Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro." European Journal of Immunology **26**(6): 1803:11.
- Larregina, A. and A. Morelli (1999). Dendritic cells in the reproductive tract. Dendritic Cells. Biology and Clinical Applications. M. Lotze and A. W. Thomson. UK, Academic Press.
- Leenen, J. P., K. Radosevic, et al. (1998). "Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: In vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover." Journal of Immunology **160**: 2166-2173.
- Lecson, T. S., C. R. Lecson, et al. (1990). Texto/Atlas de Histología. México, D.F., Interamericana-McGraw Hill.
- Levin, D., S. Constant, et al. (1993). "Role of dendritic cells in the priming of CD4⁺ T lymphocytes to peptide antigen in vivo." Journal of Immunology **151**(12): 6742-6750.
- Liu, L. M. and G. G. Macpherson (1993). "Antigen acquisition by dendritic cells: Intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo." Journal of Experimental Medicine **177**: 1299-1307.
- Liu, L. M. and G. G. Macpherson (1995). Dendritic cells "in vivo": their role in the initiation of intestinal immune responses. Advances in Mucosal Immunology. J. Mestecky. New York, Plenum Press: 271-274.
- Liu, L. M. and G. G. Macpherson (1995). "Rat intestinal dendritic cells: immunostimulatory potency and phenotypic characterization." Immunology **85**: 88-93.

- Liu, L. M., M. Zhang, et al. (1998). "Dendritic cell heterogeneity in vivo: Two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression." Journal of Immunology **161**: 1146-1155.
- Macpherson, G. G. and L. M. Liu (1999). Intestinal Dendritic Cells. Dendritic Cells: Biology and Clinical Applications. L. M. T and T. A. W., Academic Press: 141-151.
- Maliszewski, C. R., M. K. Kennedy, et al. (1998). CD40 Ligand knockout mice. Contemporary Immunology: Cytokine Knockouts. S. K. Durum and K. Muegge. Totowa, N.J., Humana Press.
- Mandel, T. E., R. P. Phipps, et al. (1980). "The follicular dendritic cell: Long term antigen retention during immunity." Immunological Reviews **53**.
- Maric, I., P. G. Holt, et al. (1996). "Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine." Journal of Immunology **156**: 1408-1414.
- Mayrhofer, G., C. W. Pugh, et al. (1983). "The distribution, ontogeny and origin in the rat of Ia-positive cells with dendritic morphology and of Ia antigen in epithelia, with special reference to the intestine." European Journal of Immunology **13**: 112-122.
- McVay, L. D. and S. R. Carding (1996). "Extrathymic origin of human $\gamma\delta$ T cells during fetal development." Journal of Immunology **157**: 2873-2882.
- McWilliam, A. S., S. Napoli, et al. (1996). "Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli." Journal of Experimental Medicine **184**: 2429-2432.
- McWilliam, A. S., P. A. Stumbles, et al. (1999). Dendritic cells in the lung. Dendritic cells: Biology and Clinical applications. Academic Press.
- Moodycliffe, M. A., V. Shreedhar, et al. (2000). "CD40-CD40 ligand interactions *in vivo* regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes." Journal of Experimental Medicine **191**(11): 2011-2020.
- Moore, K. L. (1997). Anatomía con Orientación Clínica, Editorial Médica Americana.
- Mowat, A. M. and J. L. Viney (1997). "The anatomical basis of intestinal immunity." Immunological Reviews **156**: 145-166.
- Nagashima, R., K. Maeda, et al. (1995). "Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: Their distribution, immunohistological phenotype, and function." J. Histology and Cytochemistry **44**(7): 721-731.
- Neutra, M. R. (1998). "Current concepts in mucosal immunity. V. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system." American Journal of Physiology **274**: G785-G791.
- Newby, T. J. and C. R. Stokes (1984). Local Immune Responses of the Gut, CRC Press.

- Ni, K. and H. O'Neill (1997). "The role of dendritic cells in T cell activation." Immunology and Cell Biology 75: 223-230.
- Ossevoort, M., M. Kleijmeer, et al. (1995). Functional and ultrastructural aspects of antigen processing by dendritic cells. Dendritic cells in fundamental and clinical immunology. J. Banchereau, Schmitt, D. New York, Plenum Press. 2: 227-230.
- Pavli, P., D. A. Hume, et al. (1993). "Dendritic cells, the major antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria." Immunology 78: 132-141.
- Pavli, P., L. Maxwell, et al. (1996). "Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages." Clinical and Experimental Immunology 104: 124-132.
- Pavli, P., C. E. Woodhams, et al. (1990). "Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria." Immunology 70: 40-47.
- Rescigno, M., M. Rittig, et al. (1999). Interaction of dendritic cells with bacteria. Dendritic cells: Biology and Clinical Applications. M. Lotze and A. W. Thomson, Academic Press.
- Rincón Sánchez, A. R. and N. Reyes Ortiz (1992). Manual de Microscopía Óptica. México, D.F., INNSZ.
- Ross, G. D. (2000). "Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/ $\alpha_m\beta_2$ -Integrin Glycoprotein." Critical Reviews in Immunology 20: 197-222.
- Ruedl, C., C. Rieser, et al. (1996). "Phenotypic and functional characterization of CD11c+ dendritic cell population in mouse Peyer's patches." European Journal of Immunology 26: 1801-1806.
- Sato, K., K. Ohtsuka, et al. (1993). "Detailed characterization of $\gamma\delta$ T cells within the organs in mice: classification into three groups." Immunology 80: 380-387.
- Soesatyo, M., J. Biewenga, et al. (1990). "The localization of macrophage subsets and dendritic cells in the gastrointestinal tract of the mouse with special reference to the presence of high endothelial venules." Cell Tissue Research 259: 587-593.
- Steinman, R. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annual Review in Immunology 9: 271-296.
- Steinman, R. (1999). Dendritic Cells. Fundamental Immunology. W. E. Paul. Philadelphia, EUA., Lippincott-Raven.
- Steinman, R. (2000). Comunicación personal. Guanajuato, Mexico., XVI Congreso Nacional de Inmunología.
- Steinman, R. and Z. A. Cohn (1973). "Identificación of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I Morphology, Quantitation, Tissue Distribution." Journal of Experimental Medicine 137: 1142-1162.

- Steinman, R., D. S. Lustig, et al. (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III Functional Properties In Vivo." Journal of Experimental Medicine 139: 1431-1445.
- Steinman, R., M. Pack, et al. (1997). "Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs." Immunological Reviews 156: 25-37.
- Steinman, R. and J. Swanson (1995). "The endocytic activity of dendritic cells." Journal of Experimental Medicine 182: 283-288.
- Steinman, R., S. Turley, et al. (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." Journal of Experimental Medicine 191(3): 411-416.
- Stephens, R. J. and A. W. Thomson (1999). Dendritic cells in the liver, kidney, heart and pancreas. Dendritic Cells: Biology and Clinical Applications, Academic Press.
- Tigelaar, R. E. and J. M. Lewis (1995). "Immunobiology of mouse dendritic epidermal T cells: A decade later, some answers, but still more questions." Journal of Investigative Dermatology 105: 43s-49s.
- Tomasi, T. B. (1994). An overview of the mucosal system. Handbook of mucosal immunology. P. L. Ogra, W. Strober, J. Mestecky et al, Academic Press.
- Tomohiro, K. and R. L. Owen (1994). Structure and function of intestinal mucosal epithelium. Handbook of Mucosal Immunology. P. L. Ogra, W. Strober, J. Mestecky et al, Academic Press.
- Torihashi, S., H. Ozaki, et al. (2000). "Resident macrophages activated by lipopolysaccharide suppress muscle tension and initiate inflammatory response in the gastrointestinal muscle layer." Histochemical Cell Biology 113: 73-80.
- Vandenabeele, S. and L. Wu (1999). "Dendritic cell origin: Puzzles and paradoxes." Immunology and Cell Biology 77: 411-419.
- Ventura, J. J. and R. C. Campos (1992). Estudio morfológico del tejido linfóide asociado al intestino. Inmunología de las Mucosas. A. A.G. and L. M. Cruz, Atelier Producciones.
- Wilders, M. M., T. Sminia, et al. (1983). "Ontogeny of non-lymphoid and lymphoid cells in the rat gut with special reference to large mononuclear Ia-positive cells." Immunology 50: 303-314.
- Wilson, A. D., K. Haverson, et al. (1996). "Expression of major histocompatibility complex class II antigen on normal porcine intestinal endothelium." Immunology 88: 98-103.
- Wu, S.-J., L. G. Grouard-Vogel, et al. (2000). "Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection." Nature Medicine 6(7): 816-820.
- Zhang, Y., Y. Y. Zhang, et al. (1999). "Transforming growth factor-beta 1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte-macrophage differentiation pathway." Blood 93: 1208-20.

Apéndice 1

Preparación de Soluciones

Alcoholes Graduales

Las diluciones se realizaron a partir de alcohol etílico al 96% con agua destilada, según la tabla de Gay-Lussac (Aguilar Morales, Coutiño Bello et al. 1996).

Anticuerpos

Las diluciones de los anticuerpos se realizaron a las concentraciones establecidas según las titulaciones en BSA 0.1%, y deben de realizarse al momento en el que se van a usar.

Azul de Toluidina 0.5%

Se pesan 0.5gr de azul de toluidina (Sigma) y 1gr de bórax (Sigma). Para disolverlos se calientan 100ml de agua destilada y se agrega el bórax, antes de ebulir se agrega poco a poco el azul de toluidina, si es necesario se completa el volumen inicial. La solución se deja enfriar y se filtra. Se mantiene a temperatura ambiente y se recomienda filtrarla cada 30 días.

BSA 0.1%

Se pesan 0.25gr de BSA (Sigma) y se disuelven poco a poco en 200ml de solución salina 0.85%, posteriormente la solución se pasa a un matraz aforado de 250ml y se afora al volumen total. Se almacena a 4°C. Se recomienda esterilizar por filtración la solución si se va almacenar.

Cacodilato de Sodio 0.1M

Se pesan 17.12gr de Cacodilato de Sodio (Electron microscopy sciences), los cuales se disuelven en 200ml de agua destilada y se ajusta el pH a 7.2 (con HCl 1N). Se afora la solución a 1lt y se almacena a 4°C.

DAB

La DAB (Gibco BRL) debe pesarse rápidamente debido a que es altamente tóxica y se absorbe a nivel cutáneo. Se pesan 3mg y se disuelven en 6ml de Tris y a la solución obtenida se le agregan 30 μ l de H₂O₂ 30%. La solución debe de prepararse al momento de usarse.

EDTA 0.5 M

Este reactivo se prepara en una solución 0.5N de NaOH, en 950ml de ésta se disuelven poco a poco 186.12gr de EDTA, una vez disuelto por completo se ajusta el pH a 7.4 y se afora el volumen a 1lt. Esta solución debe de mantenerse a 4°C.

Epon 812

La resina Epon 812 (Electron microscopy sciences) se prepara a base de 2 Stocks, el A y el B, cuya composición se describe a continuación.

- Stock A: Consta de 31gr de Epon 812 y 100gr de Dodecenil Anhidrido Succínico (DDSA), debido a la alta viscosidad de estos dos componentes, deben agitarse perfectamente para que la composición final de la resina sea la correcta. El stock se almacena a 4°C.
- Stock B: Consta de 50gr de Epon 812 y 44.5gr de Anhidrido Metil Nádic (NMA), esta mezcla también debe agitarse perfectamente. El stock se almacena a 4°C.

Para preparar la resina de uso se mezclan 2 unidades del stock A y 3 del stock B, además, debe agregarse el catalizador Tri-metilaminometil-fenol (DMP-30) 0.15ml por cada 10ml de resina a preparar.

Glutaraldehido 2.5%

Este reactivo debe prepararse en la campana de extracción, se usan 190ml de cacodilato de sodio 0.1M, en los cuales se disuelve poco a poco el contenido de una ampollita de glutaraldehido 50% (Electron microscopy sciences). La solución se almacena a 4°C.

PBS

Se pesan 8.0gr de NaCl, 0.2gr de KCl, 1.15gr de Na_2PO_4 y 0.2gr de K_2HPO_4 . En la parrilla de agitación se colocan 950ml de agua bidestilada y se disuelven uno a uno los reactivos pesados. Una vez disueltos se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza en autoclave inmediatamente.

Peróxido 3%

De la solución stock de peróxido al 30% (Productos Químicos Monterrey), se realiza una dilución 1:10 con solución salina para obtener una concentración final de 3%. La solución debe de prepararse en el momento y cubrirse de la luz con papel aluminio.

Solución Salina 0.85%

Se pesan 17gr de NaCl (Baker), y se disuelven en 1.5lts de agua destilada, posteriormente la solución se pasa a un matraz aforado de 2lts y se afora al volumen total. Se almacena a 4°C.

Tetraóxido de Osmio (OsO_4) 2%

Este reactivo debe prepararse en la campana de extracción, la ampollita de Tetraóxido de Osmio con 1gr (Electron microscopy sciences) debe lavarse perfectamente con agua y jabón, posteriormente, y sin tocarla con los dedos se limpia con alcohol etílico al 100% y por último con agua destilada. En un matraz con tapón esmerilado se colocan 50ml de agua bidestilada y se procede a abrir la ampollita, esta se deja caer en el agua. El matraz debe protegerse de la luz. El reactivo tarda en disolverse 24hrs. Siempre que se use este reactivo debe utilizarse la campana de extracción.

Apéndice 2

Lista de Reactivos

Reactivo	Proveedor
Acetona	Productos Químicos Monterrey
Anticuerpo conejo anti-rata, Biotinado	Vector Laboratories
Anticuerpo rata anti-CD11b de ratón(Mac-1)Biot	Pharmingen.
Anticuerpo rata anti-MHC CII de ratón	Hibridoma NIM-R4
Anticuerpo rata anti-Thy-1 de ratón	ATCC
Alcohol etílico 96°	Productos Químicos Monterrey
Azul de toluidina	Sigma
BSA	Sigma
Bórax	Sigma
Cacodilato de Sodio	Electron microscopy sciences
DAB	Gibco, BRL
EDTA	Baker
Epon 812	Electron microscopy sciences
Estreptavidina conjugada con Peroxidasa	SBA
Glutaraldehido	Electron microscopy sciences
KCl	Baker
NaCl	Baker
Na ₂ PO ₄	Baker
Óxido de propileno	Electron microscopy sciences
Peróxido	Productos Químicos Monterrey
Poli-mount	Polysciences
Suero de Chivo	Sigma
Tetraóxido de Osmio	Electron microscopy sciences